

PCR이란?

PCR(polymerase chain reaction)법은 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관 내에 대량으로 증폭하는 획기적인 기술이다.

그 원리는 극히 단순하고, 쉽게 응용할 수 있기 때문에

순수 분자생물학 분야 이외에도 의학, 이학, 농학, 수의학, 식품과학, 환경과학 뿐만 아니라 고고학이나 인류학에 이르는 분야까지 그 활용범위를 넓혀가고 있다.

PCR증폭효율에 영향을 미치는 요인으로는 ① 각 단계의 반응온도와 시간,

② cycle수, ③ 반응액 조성(주형 DNA, dNTP농도, Mg^{2+} 농도 등),

④ primer 설계, ⑤ 사용 DNA polymerase 등이 있다.

또한 몇 가지 반응첨가물(DMSO, 비이온계면활성제, 글리세롤) 등에 따라 반응촉진효과가 나타나는 경우가 있다.

1. 반응조건

PCR은 통상적으로 다음 세 가지 반응단계로 이루어져 있다 (그림 1).

(1) DNA변성(Denaturation)

일반적으로 두가닥 DNA를 94℃에서 15~30초간 처리하여 각각 한가닥 DNA로 분리시킨다. 너무 온도를 높이거나 처리시간을 지나치게 늘리면 내열성 DNA polymerase 라 해도 활성을 잃게되므로 주의가 필요하다.

(2) Primer의 Annealing

열처리로 한가닥으로 변성한 DNA와 primer를 공존시킨 후 온도를 낮추면 2종류의 primer는 각각 상보적인 한가닥 주형 DNA에 annealing한다. Annealing에 가장 적합한 온도와 시간은 primer의 염기배열과 그 길이에 따라 결정되지만 일반적으로 55℃에서 30초~1분간 annealing 한다. Annealing 온도를 높이면 primer-주형 DNA의 mismatch가 감소되어 반응 특이성이 높아진다. 그러나 혼합 primer 또는 mismatch를 갖는 primer를 사용할 경우는 37~45℃로 annealing 온도를 낮출 필요가 있다.

(3) 신장반응(Extension)

4종류의 기질(dNTP)이 공존하는 상태에서, DNA polymerase를 작용시켜 primer를 신장시킨다. 신장반응에 필요한 시간은 주형 DNA의 농도, 증폭단편의 크기, 반응온도에 따라 좌우되지만 일반적으로는 *Thermus aquaticus*(Taq) polymerase를 사용할 경우 72℃에서 30초~10분간(증폭크기 약 10 kbp)처리한다. Taq polymerase에 의한 DNA 합성속도(약 60 nucleotides/sec, 70℃)¹⁾를 고려하여 시간을 설정한다.

최근 primer의 annealing 단계, 신장반응 단계를 동일한 온도에서 하는 shuttle PCR도 실행되고 있다.

예) 94℃ 30초 (변성단계)

60~68℃ 1~10분 (annealing, 신장단계)

25~40 cycles

Shuttle PCR을 함으로서 반응시간을 단축하고 고온에서 annealing하기 때문에 특이성이 높은 PCR을 기대할 수 있다. 필자의 경험으로 미루어 보아 보다 긴 크기(5 kbp 이상)의 증폭에는 shuttle PCR이 적합하다.

(4) Cycle 수

PCR의 경우 n회의 cycle로 표적배열은 2ⁿ배가 되지만 실제로는 이보다 낮다. 효율이 저하되는 이유는 ① DNA polymerase의 실활 및 증폭단편(주형DNA)의 증가로 인한 효소분자/주형비의 부족, ② 증폭단편간의 annealing 되는 속도가 빨라져서 primer의 anneal과 경합한다.

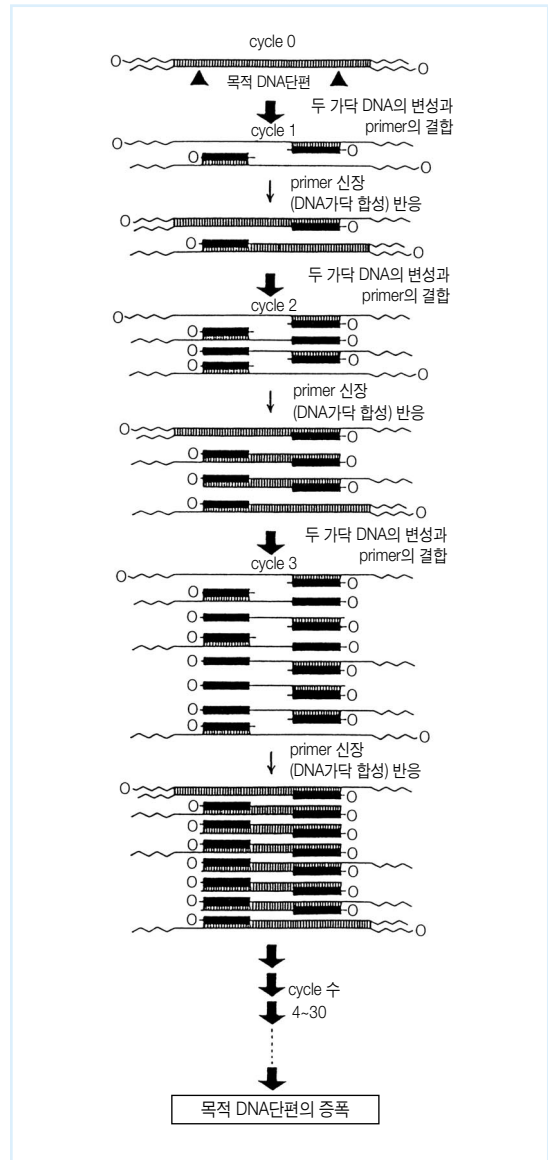


그림 1 PCR법의 원리

목적하는 DNA영역을 사이에 둔 2종류의 primer를 사용하여 tube내에 연속적인 효소반응으로 증폭시키는 방법이다. DNA polymerase에 의한 주형특이적인 DNA 합성을 반복하여 목적하는 DNA 단편을 수십만배나 증폭시킬 수 있다.

③ Pyrophosphate 축적으로 인한 효소반응 저해 등이 일어날 수 있다. 일반적으로 25~35 cycles의 반응이 이루어지지만 증폭산물이 증가되면 그 자신이 primer가 되어 2차적인 반응이 일어나기 쉬우므로 비특이적인 DNA의 증폭을 일으키게 된다. 따라서 반응 cycle 수를 불필요하게 증가시키는 것은 바람직하지 않다. 물론 반응개시의 경우 주형 DNA량이 미량일 경우에는 일반적인 경우보다 cycle 수를 늘릴 수 있다. 최근에는 1 copy로부터 PCR도 가능하게 되었다. 이 경우는 단지 반응 cycle수를 증가시키는 것이 아니라 nested PCR을 실행한다. 이것은 1회째의 PCR산물을 희석하여 주형으로 삼고 primer의 안쪽에 설정된 다른 primer를 사용하여 2회째 PCR하는 것이다. 또한 random primer를 사용하여 주형 DNA를 증폭하는 primer extension preamplification(PEP법)이 고안되었다²⁾. 이것은 시료 DNA를 주형으로 하여 우선 임의의 서열을 갖는 짧은 primer(9~15 mer정도)를 사용한 비특이적인 신장반응으로 주형 DNA의 거의 모든 영역을 증폭한 다음 그 일부를 주형으로 하여 1회 더 primer 특이적 PCR을 하는 것이다.

2. 반응액의 조성

(1) 내열성 DNA Polymerase

수 종류의 내열성 DNA polymerase가 시판되고 있는데 반응에 사용하는 완충액의 조성이 다를 수 있으므로 주의가 필요하다. *TaKaRa Taq*을 사용할 때 DNA합성의 최적 온도는 대개 70~80℃이고 그 합성속도는 60 nucleotides 이상/초이다. 활성 반감기는 92.5℃에서 130분 이상, 95℃에서 약 40분, 97.5℃에서 약 10분간이다.

(2) Mg^{2+} 농도

일반적으로 PCR반응에서는 1.5~2.5 mM의 Mg^{2+} 농도가 필요하다. Mg^{2+} 농도는 PCR을 실행할 때 다음의 사항에 관여하고 있는 것으로 여겨진다. ① 효소활성, ② primer의 annealing, ③ 합성된 DNA의 충실성, ④ primer-dimer의 형성 등이다. 킬레이트제(예를 들면 EDTA)는 반응액 속의 Mg^{2+} 농도에 영향을 미치므로 주형으로 사용하는 DNA 용액에서 turn over하는 것에 주의할 필요가 있다. 또한 유효한 Mg^{2+} 농도는 dNTP 농도와도 관계가 있으므로 어느 실험에서나 최적 Mg^{2+} 농도를 결정하고자 할 경우 항상 dNTP 농도를 고려해야 한다. 일반

적으로 Mg^{2+} 농도가 높아지면 DNA 합성의 정확도에 영향을 미칠뿐만 아니라 두가닥 DNA 변성이 어려워지고, *Taq* polymerase는 10 mM $MgCl_2$ 에 의해 40~50%의 저해를 받으므로 $MgCl_2$ 를 과잉 첨가하는 것은 바람직하지 않다.

(3) dNTP

PCR의 효율, 특이성면에서 보면 20~200 μ M에서 양호한 결과를 얻을 수 있다. DNA polymerase가 잘못된 dNTP를 사용하는 mismatch 현상은 dNTP 농도에 강하게 의존한다^{3,4)}. dNTP 농도를 낮추는 쪽이 PCR 특이성과 정확도가 높아지므로 dNTP 농도를 낮추면 mispriming이 감소하여 PCR의 정확도가 높아진다⁵⁾. 단 사용하는 Mg^{2+} 농도에 따라 dNTP의 최적농도가 달라지므로 주의가 필요하다.

(4) 주형 DNA, RNA

PCR법은 여러 가지 형태의 DNA와 RNA를 주형으로하여 사용할 수 있다. 가장 간편한 DNA 조제법으로는 소수의 조직배양 세포를 비등한 증류수 속에서 가용화하여 PCR에 사용하는 방법이다⁶⁾. 또한 사람의 한 가닥의 머리털로부터 PCR 증폭하는 다형분석⁷⁾, 포르말린으로 고정한 파라핀포매조직 조각으로 PCR도 실시하고 있다^{8,9)}. 혈액에서 주형 DNA를 조제할 때는 헤모글로빈이나 포르피린 기타 미지물질이 PCR 반응을 저해하는 점에 주의가 필요하다¹⁰⁾. 최근 법의학 분석에서 전혈 또는 머리털을 마이크로파 처리하여 그대로 PCR에 이용한다는 보고도 있다¹¹⁾. 주형 DNA 양으로는 1단계 PCR에서 $10^5 \sim 10^6$ 분자에 상당하는 양이 있으면 양호한 결과를 얻을 수 있고 3×10^5 개의 분자는 human genome DNA에서는 1 μ g, 효모 DNA에서는 10 ng, 대장균 DNA에서는 1 ng에 상당한다. 그러나 앞에서 기술한 바와 같이 nested PCR, PEP법을 이용하면 1분자 DNA로부터의 PCR도 가능하다. RNA를 우선 역전사 효소로 cDNA로 변환한 후에 PCR을 하는 방법을 일반적으로 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)이라 한다. 소수의 세포로부터의 mRNA 또는 극히 미량밖에 발현되지 않은 mRNA의 검출, 반정량에 사용할 수 있다. 또한 RT-PCR은 임상 시료에 따라 다수의 세포를 얻기 어려운 경우, 소수의 세포로부터 완전한 cDNA cloning 하는데도 유용하다. RT-PCR용 시료의 정제용으로 Catrimox-14는 양이온 계면활성제로서 세포를 용해하여 RNA와 DNA 복합체를 형성한

다. 이 복합체에서 간편한 방법으로 보다 효율 좋게 RNA를 회수할 수 있고, 또한 Catrimox-14는 ribonuclease 저해 작용을 하기 때문에 혈액,¹⁴⁾ 동물 배양세포,¹⁵⁾ 동물 조직으로부터의 RNA 추출에 매우 유효하다.

(5) 반응첨가물

많은 염기배열을 복수의 primer set를 사용하여 동시에 1개의 반응 tube 내에서 PCR 증폭하는 방법을 다중 PCR(multiplex PCR)이라 한다. 근육병의 원인인 디스트로핀 유전자의 결실변이를 18종류의 primer를 사용하여 검출할 수 있다¹⁶⁾. 일반적으로 multiplex PCR반응액에는 10%(v/v) dimethylsulfoxide(DMSO)를 함유한다¹⁷⁾. 유기용매는 보통 Taq polymerase에는 적합하지 않지만 multiplex PCR에는 필수적이다.

Taq polymerase의 저해물질로서 SDS(<0.01%)가 알려졌다. 비이온 계면활성제 Tween-20이나 nonidet-P40의 첨가로 그 저해를 억제할 수 있다. 또한 DMSO(2~5%), PEG6000(5~15%), 글리세롤(5~20%), 포름아마이드(5%)나 BSA(bovine serum albumine)첨가로 반응 촉진효과를 얻을 수도 있다.



참고문헌

- 1) Inni, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., Brow, M. A. D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9436-9440(1988).
- 2) Zhang, L., Cui, X., Schmit, K., Hubert, R., Navidi, W., Arnheim, N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5847-5851(1992)
- 3) Innis, M., Myabo, K., Gelfald, D., Brown, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9436-9440(1988).
- 4) Mendelman, L., Boosalis, M., Petruska, J., Goodman, M. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 14415-14423(1989)
- 5) Petruska, J., Goodman, M., Boosalis, M. S., Sower, L., Cheong, C., Tinoco, I. Jr. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6252-6256(1988)
- 6) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263-273(1986).
- 7) Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. H., Erlich, H., A. : *Nature*, **322**, 543-546(1998).
- 8) Imprim, C. C., Saiki, R. K., Erlich, H. A., Teplitz, R. L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 710-716(1987).
- 9) Shibata, D., Martin, W. J., Amheim, N. : *Cancer Res.*, **48**, 4564-4566(1988).
- 10) Higuchi, R. : *Amplifications, Perkin-Elmer Cetus.*, **1**, 1-3(1989).
- 11) Ohhara, M. Y., Kurosu, M. E. : *BioTechniques.*, **17**, 726-728(1994)
- 12) Ferre, F., Giarduno, F. : *Nucl. Acid Res.*, **17**, 2141(1989).
- 13) Belyarski, A., Vinogradova, T., Rajuwsky, K. : *Nucl. Acid Res.*, **17**, 2919-2932(1989).
- 14) Macfarlane, D. E., Dahle, C. E. : *Nature.*, **362**, 186-188(1993).
- 15) Dahle, C. E., Macfarlane, D. E. *BioTechniques.*, **15**, 1102-1105(1993).
- 16) Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen P. N., Caskey, C. T. : *Nucl. Acid Res.*, **16**, 11141-11156(1988).
- 17) Kogen, S. C., Doherty, M., Gitscher, J. : *N. Engl. J. Med.*, **317**, 985-990(1987).

내열성 DNA polymerase

PCR 기술의 자동화에 있어서 핵심요소는 DNA polymerase의 내열성에 있으므로 호열성 세균이 생산하는 내열성 DNA polymerase을 PCR에 응용하여 성공적으로 실용화할 수 있게 되었다. 본 고에서는 최초로 PCR에 이용된 호열성세균 *Thermus aquaticus* 유래의 DNA polymerase(*Taq* polymerase)를 중심으로 그 후 개발된 몇 개의 내열성 polymerase를 포함하여 소개하고, 생화학적 성질에 대해 설명한다.

PCR에 사용하는 내열성 DNA polymerase는 그 상품가치가 높아 개발경쟁이 치열했지만 PCR기술 그 자체의 권리와 함께 그것에 사용되는 내열성 DNA polymerase의 특허가 94년에 성립되어, 현재 그 권리는 Hoffmann-LaRoche사가 가지고 있다.

이 특허의 권리범위는 넓고 내열성효소의 물리화학적 성상으로 규정되어, *Taq* polymerase에만 한정된 것이 아니다. 따라서 PCR용 효소 제품은 반드시 license를 받아야 판매가 가능하다.

1. DNA Polymerase의 분류

DNA polymerase는 그 기능상 모든 생물이 가지고 있다고 생각된다. 분자생물학이 발전하기 이전에는, DNA polymerase를 기질특이성과 저해제에 대한 감수성 등으로 분류하였지만 유전자가 클로닝되어 아미노산서열이 추정되면서 구조적으로 분류되기 시작하였다. 이에따라 크게 구분하여 대장균 DNA polymerase I으로 대표되는 Pol I family, 그리고 사람 DNA polymerase α 로 대표되는 α -family로 분류되어 왔다. 최근에는 50종류 이상의 DNA polymerase들의 유전자구조가 밝혀져 family A, B, C, X의 4종류로 분류하는 것이 제창되고 있다. 그 중 위의 두가지 family는 각각 A와 B에 속하고, C는 대장균 DNA polymerase III로, X는 사람 DNA polymerase β 와 Terminal transferase로 대표된다. 같은 family에 속하는 것은 공통의 아미노산 서열을 가지고 있고 효소의 생화학적 성질, 예를 들면 DNA 합성속도, process에 의해 효소가 기질 DNA에 결합해서 분리 될 때까지 합성되는 nucleotide의 수, 주형-primer 종류에 대

한 선호성이나 저해제에 대한 감수성에 있어서 유사하다.

한편, PCR에 사용할 수 있는 DNA polymerase의 절대 조건은 내열성이므로 호열성 세균 및 초호열성 세균이 가지고 있는 DNA polymerase가 대상이 된다. 현재 시판하고 있는 주요 내열성 DNA polymerase를 표 1에 정리하였다. 이들 효소는 모두 호열성 진정세균 유래이거나 초호열성 고세균에서 유래한 것이다. 진정세균 유래는 앞에 서술한 Pol I family에 속하고 고세균 유래는 α -family에 속한다. *Taq* polymerase와 *Tth* polymerase 등의 Pol I 형 효소는 시험관내에서의 DNA 가닥 신장활성이 강해 PCR에 적합하지만 합성시 잘못 합성 (mismatching)하는 것을 막아주는 3' \rightarrow 5' exonuclease 활성이 없는 것이 많다. 이에 비해, α -family에 속하는 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase는 3' \rightarrow 5' exonuclease 활성이 강해 DNA 합성의 충실도가 높은 반면 신장활성이 약하다. α 형 효소중에는 신장성을 높이기 위해 exonuclease 활성을 제거한 변이체로 시판하는 것도 있지만 이들의 신장성도 Pol I 형 효소만큼 강하지

| Family | 유래 | 제품명 | 비고 |
|------------|------------------------------------|---|---|
| | <i>Bacillus caldotenax</i> | <i>Bca</i> BEST DNA polymerase[TaKaRa] | 5' \rightarrow 3' exo 활성을 상실한 변이체 |
| | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | <i>Bst</i> DNA polymerase[BioRad] | 5' \rightarrow 3' exo 활성을 상실한 변이체 |
| | <i>Thermus aquaticus</i> | <i>TaKaRa Taq</i> [TaKaRa] ^{a)} | 5' \rightarrow 3' exo 활성을 상실한 |
| | | <i>Ampli Taq</i> [Perkin Elmer] ^{a)} | Stoffel fragment[Perkin Elmer] |
| | | <i>Taq</i> DNA polymerase[파마사 등] | Gene Taq, Δ Taq[Amersham] |
| Pol I 형 | <i>Thermus thermophilus</i> | <i>Tth</i> DNA polymerase[Toyobo 등] ^{a)} | 역전사활성이 있고, single tube RT-PCR에 이용 가능 |
| | | <i>rTth</i> DNA polymerase[Perkin Elmer] | 5' \rightarrow 3' exo 활성이 결실된 |
| | | | Δ Tth DNA polymerase도 있다. |
| | <i>Thermus flavus</i> | <i>Tfi</i> DNA polymerase[Promega] | |
| | <i>Thermus ubiquitos</i> | <i>Hot Tub</i> DNA polymerase[Amersham] ^{a)} | |
| | <i>Thermotoga maritima</i> | <i>Ultma</i> DNA polymerase[Perkin Elmer] ^{a)} | 3' \rightarrow 5' exo 활성을 가지고 있다. 5' \rightarrow 3' exo 활성은 상실되어 있다. |
| α 형 | <i>Pyrococcus furiosus</i> | <i>Pfu</i> DNA polymerase[Stratagene] ^{a)} | 3' \rightarrow 5' exo 활성결손 변이체도 시판되고 있다. |
| | <i>Pyrococcus sp.</i> (GB-D) | <i>Deep Vent</i> DNA polymerase[NEB] | " |
| | <i>Thermococcus litoralis</i> | <i>Vent</i> DNA polymerase[NEB] | " |
| | | <i>Tli</i> DNA polymerase[Promega] | |
| | <i>Pyrococcus woesei</i> | <i>Pwo</i> DNA polymerase[B.M.] ^{a)} | |
| 혼합형 | | <i>TaKaRa Ex Taq</i> [TaKaRa] ^{a)} | |
| | | <i>TaKaRa LA Taq</i> [TaKaRa] ^{a)} | |
| | | <i>rTth</i> DNA polymerase XL[Perkin Elmer] ^{a)} | |
| | | <i>Taq Plus</i> DNA polymerase[Stratagene] ^{a)} | LA-PCR용으로 조제된 효소 |
| | | ϵ LONGASE Amplification System[GibcoBRL] ^{a)} | |
| | | Expand Long Template PCR System[B.M.] ^{a)} | |

a) PCR 효소로서 권리를 갖고 있는 제품

않다. Pol I 형 효소로서 3'→5' exonuclease 활성을 갖고 있는 것으로 유일하게 초호열성 진정세균 *Thermotoga maritima* 유래의 *Ultma* polymerase가 시판하고 있지만 exonuclease 활성은 α 형 효소보다 약하다.

지금부터 다른 생화학적 성질도 포함하여 구체적으로 PCR 효소의 특징을 설명한다. 표 1에서 *BcaBEST* polymerase와 *Bst* polymerase는 내열성 면에서는 PCR에 적합하지 않다(뒤에 기술).

2. 생화학적 성질

(1) 내열성

DNA polymerase의 내열성은 그 효소를 생산하는 호열성 세균의 생육온도와 연관성이 있다. 필자들의 측정결과 *Taq* polymerase의 내열성은 연속적으로 92.5℃에 놓아두면 160분 후에도 80% 이상의 활성을 가지고 있다. 96℃에서는 35분에 활성이 반감하지만, 96℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분의 사이클로 반복하면 40 cycles에서 반감한다. 이것은 PCR반응에는 충분한 열안정성이다. *Taq* polymerase를 생산하는 *Thermus aquaticus*는 80℃에서도 증식가능한 고도호열성 진정세균이지만 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase를 생산하는 *Pyrococcus furiosus*와 *Thermococcus litoralis*는 초호열성 고세균으로 100℃에서도 증식이 가능하기 때문에 효소의 내열성도 보다 높다. 발매회사에 따르면 *Pfu* polymerase는 95℃, 60분에 95% 이상의 활성이 있고, *Vent* 및 *Deep Vent* polymerase는 95℃에서의 반감기가 각각 6.7시간, 23시간이다. *BcaBEST*와 *Bst* polymerase는 중 정도의 호열성의 *Bacillus*속 유래이기 때문에 내열성이 낮아 75℃에서 30분 이내에 완전히 활성을 잃는다. 이 때문에 이들 효소는 PCR반응에 사용할 수 없다. 그러나 필자들은 *BcaBEST* polymerase의 뛰어난 primer 신장활성을 발견하여(후에 서술), 이 효소를 dideoxy sequencing용 효소로서 개발했다.

효소의 내열성과는 별도로 반응 최적온도는 기질인 주형과 primer 사이의 안정성과 연관된다. 필자들은 활성화 DNA를 사용해 DNA polymerase의 반응 최적온도를 구하고 있지만 85℃ 이상에서는 주형-primer가 변성하여 기질로 되지 않는다. PCR의 경우도 primer의 annealing 효율을 감안하면 DNA polymerase에 관계없이 신장반응은 70~75℃가 적당하다고 생각된다.

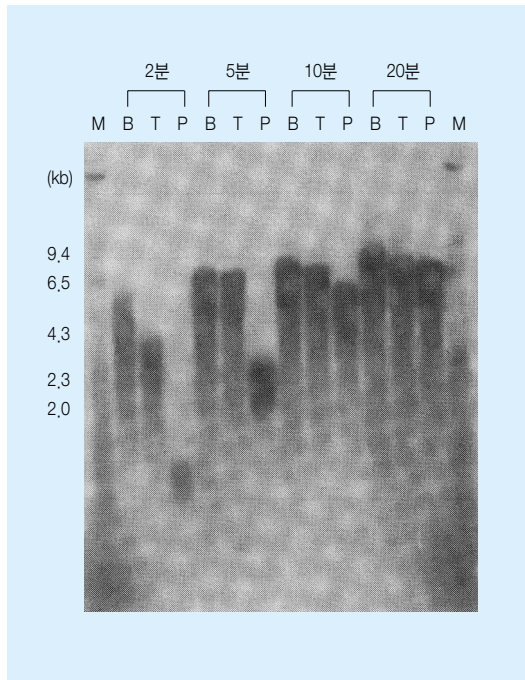


그림 1 DNA polymerase에 의한 primer 신장활성의 비교

M13 한가닥 DNA에 상보적인 배열을 갖는 45잔기의 primer를 합성하여 양자를 annealing시켰다. 주형-primer - 22 μ g에 [α - 32 P]dCTP를 함유하는 dNTP혼합액과 0.6 U의 DNA polymerase를 첨가해 신장반응을 개시한 후, 2분, 5분, 10분, 20분에 각각 같은 양씩 취해 EDTA로 반응을 정지시켰다. *BcaBEST*는 65℃, *Taq*과 *Pfu*는 72℃에서 반응을 실시했다. 합성가닥은 alkali agarose gel 전기영동으로 분리하여 autoradiography를 행했다.

B: *BcaBEST* polymerase T: *Taq* polymerase P: *Pfu* polymerase

(2) DNA가닥 신장능력

Pol I 형의 효소는 시험관 내에서의 DNA 신장활성이 강하다. 예를 들면 M13 phage의 한가닥 DNA에 primer를 하나 annealing하고 DNA polymerase를 첨가 한 뒤 합성능력을 비교해 보았다. Pol I 형인 *Taq* polymerase(TaKaRa) 및 *BcaBEST* polymerase(TaKaRa)와 α 형 효소인 *Pfu* polymerase(Stratagene) 등을 활성화 DNA를 주형-primer로 하여 얻은 활성으로부터 동일한 활성단위(0.6 U)를 사용하여 primer 신장을 시작한 후 시간경과에 따른(그림 1) 신장능력을 비교하였다. 이 결과 *BcaBEST*, *Taq*에 비해 *Pfu* polymerase의 신장능력은 낮았다. 약 8 kb의 M13 DNA를 일주하는데 *BcaBEST*, *Taq*은 5분 이내인데 반하여 *Pfu*는 20분 정도 소요된다. 이에 관해서는 다음에 실패를 들겠지만 PCR반응에 있어서는 불리한 성질이다.

(3) 정확도(fidelity)

DNA polymerase의 DNA 합성에 있어서 정확도는 돌연변이 출현빈도로 나타난다. 예를 들면 *Taq* polymerase에서 보고되고 있는 $1 \sim 2 \times 10^{-4}$ 수치^{1,15,16)}는 1회의 DNA 가닥합성시 10,000 nucleotide에 1~2개의 비율로 주형 DNA와 mismatch를 일으키는 변이가 생기는 것을 의미한다. 돌연변이 빈도측정으로 각 DNA polymerase의 정확도를 비교할 수 있지만, 이 값은 측정조건에 크게 영향을 받는다. 즉, dNTP의 농도, 주형-primer의 종류, 그리고 반응온도, 염과 금속이온의 종류, 변이 검출의 방법 등이 다르면 결과도 달라진다. 따라서 DNA polymerase의 충실도를 비교할 때는 동시에 같은 조건으로 변이빈도를 측정해야 한다. 같은 조건에서 측정한 예로서는 표 2와 같은 결과가 보고 되어 있다. 이들 결과를 보면 역시 3'→5' exonuclease 활성이 있는 α -family의 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase의 정확도는 *Taq* polymerase보다 높다. PCR로 목적의 DNA영역을 증폭하는 경우, 조금이라도 정확도가 높은 쪽이 유리하며 특히 증폭단편을 cloning에 이용하고자 하는 경우와 목적의 증폭영역이 짧은 경우(통상 2 kbp 이하), 정확도가 높은 효소를 사용하는 것이 좋다. 반면에 인위적으로 유전자의 돌연변이를 유도하는 경우에는 PCR 증폭시 가능하면 더 많은 부위에서 reading-error가 발생할 수 있도록 하여, 무작위로 많은 종류의 변이체를 얻는 방법이 더 유리하다. 돌연변이 유발(mutagenic) PCR이라고 불리는 이 경우 DNA polymerase의 정확도가 낮은 쪽이 바람직하다. *Taq* polymerase를 이용해서 변이유발 빈도를 올리는 PCR protocol이 보고되어 있다^{17,18)}. 이 보고에 의하면 mismatch 염기쌍을 더욱 안정화시키기 위해 $MgCl_2$ 의 농도를 높게하고, DNA polymerase의 주형 특이성을 낮추기 위해 $MnCl_2$ 를 첨가하는 등의 방법이 연구되어 있다. 그 밖의 다른 DNA polymerase를 이용한 돌연변이 유발 PCR의 보고는 없다.

(4) Terminal extension 활성

DNA polymerase를 사용 시험관 내에서 DNA합성의 경우, 여러 DNA polymerase에 의한 합성가닥은 주형 DNA의 3' 말단에서 정확하게 멈추지 않고 1개의 nucleotide가 여분으로 부가된다^{19,20)}(그림 2). DNA polymerase가 가지고 있는 terminal transferase 활성을 말단기 부가 활성이라 부르지만 그 강도는 DNA polymerase의 종류에 따라 다르고, 같은 DNA polymerase라도 주형 DNA 말단의 서열

| DNA polymerase | 변이빈도 | 문헌 |
|------------------|----------------------|----|
| <i>Taq</i> | 2.0×10^{-4} | 40 |
| <i>Vent</i> | 6.6×10^{-5} | |
| <i>Taq</i> | 7.2×10^{-5} | 40 |
| <i>Vent</i> | 4.5×10^{-5} | |
| <i>Taq</i> | 8.9×10^{-5} | 41 |
| <i>Vent</i> | 2.4×10^{-5} | |
| <i>Taq</i> | 2×10^{-5} | 8 |
| <i>Pfu</i> | 2×10^{-6} | |
| <i>Tfi</i> | 2.1×10^{-4} | |
| <i>Vent</i> | 3×10^{-5} | 42 |
| <i>Vent(exo)</i> | 4.4×10^{-4} | |

표 2 DNA polymerase에 의한 변이발생 빈도의 비교

에 따라 다르다. 이 성질은 PCR에 의한 증폭 DNA 단편을 plasmid vector에 삽입하고 싶은 경우에 중요한 문제가 된다. 말단기 부가 활성에 의한 3' 말단에서의 1 nucleotide 부가는 전가닥에서 일어나는 것이 아니기 때문에, PCR 산물의 말단은 평활말단과 1 nucleotide가 돌출한 것이 섞여 있어, 사용하는 DNA polymerase의 종류나 primer의 서열 등에 따라 그 혼합비도 다르다. 따라서, PCR 산물을 평활말단화한 벡터에 연결하는 것만으로 목적의 형질전환체를 얻을 수 있는 확률은 극히 낮다. 3' 말단에 부가하는 nucleotide는 거의 deoxyadenosine이므로 T 벡터라 불리는 dideoxythymidine이 하나 3' 말단에 돌출한 open circular 벡터가 개발되어 시판하고 있다. 3'→5' exonuclease 활성이 강한 DNA polymerase는 평활말단을 가지고 있는 산물을 생성하여 cloning 과정에서 상기의 내용을 고려하지 않아도 된다는 보고가 있다^{21,22)}. 필자들은 multicloning site에 0.5 kbp의 *Haemophilus influenzae* DNA가 삽입된 pUC계 plasmid를 주형으로 하여 클로닝부위 바깥쪽의 공통 primer로 PCR을 실시한 후, 그 산물을 cloning하는 방법으로 DNA polymerase의 차이에 따라 수반되는 효율성의 차이를 조사해 보았다²³⁾. PCR산물을 T4 DNA polymerase로 평활화하고, T4 P. N. kinase로 5'-인산화한 후, 탈인산화벡터와 연결하는 방법(A)과, 직접 T 벡터와 연결하는 방법(B)(그림 2)으로 클로닝한 결과를 표 3에 나타내었다. *Pfu* polymerase에 의한 산물이라도 충분한 효율로 T 벡터에 직접 삽입할 수 있다는 것을 알 수 있다. 실제로 PCR 산물을 변성 polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 결과 1 nucleotide의 부가 비율은 *Taq*, *Ex Taq*(후

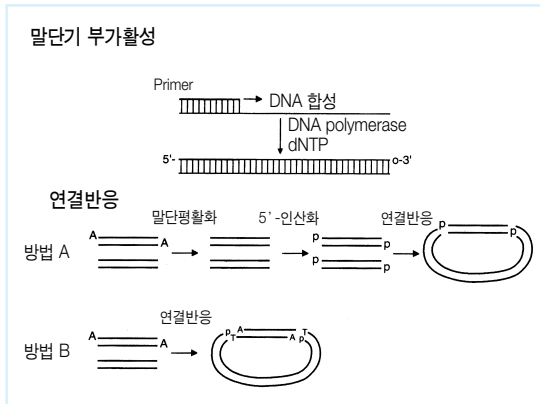


그림 2 DNA polymerase의 말단기 부가 활성

DNA polymerase에 의한 primer 신장반응은 주형DNA의 말단에서 멈추지 않고 1 nucleotide 돌출한다.

술), *Pfu*에서 각각 산물전체의 60~70%, 50~60%, 30~40%를 각각 차지했다.

PCR 산물이 다양한 product로 혼합되어 있으면 SSCP (single-stranded conformation polymorphism) 분석, DGGE (denatured gradient gel electrophoresis) 등의 돌연변이 검출실험과 microsatellite 다형 검출실험의 경우에 전기영동 패턴의 판정을 곤란하게 한다. 필자들의 실험에서는 *Taq* polymerase를 이용한 실험의 결과가 판정이 곤란한 경우에 *Pfu* polymerase를 이용해도 마찬가지로 결과가 많았다. 이와 같은 실험에서는 평활형이든 돌출형이든 한쪽으로부터 생성이 가능하도록 산물을 증폭해 주는 방법의 개발이 시급하다.

(5) 역전사활성

대장균의 Pol I 에 역전사활성이 있는 것은 오래전부터 알려져 왔지만^{24,25)}, PCR의 출현 후 *Taq* polymerase의 역전사 활성을 이용하여 mRNA로부터 한번에 PCR까지 수행하는 방법이 보고되었다^{26~28)}. 그러나 증폭에는 다량(1~5 μ g)의 RNA가 필요하거나 소량의 RNA로는 검출에 southern hybridization법이 필요하였기 때문에 실용적이지 않았다. 그 후 *Tth* polymerase 등 보다 강한 역전사활성이 있는 효소가 발견되어 single tube RT-PCR(역전사 PCR)이 실용화되었다. *Tth* polymerase의 역전사활성은 금속이온 Mn^{2+} 가 존재하면 보다 강해지기 때문에 $MnCl_2$ 존재하에서 역전사반응을 실시하고, EGTA로 킬레이트한 후 $MgCl_2$ 를 첨가해 PCR을 실시하는 방법이 이용되고 있

| 방법 | DNA pol. | cloning 수 백색 청색 | cloning 효율(%) |
|--------------------|------------|--------------------|------------------|
| A (평활화 cloning) | <i>Taq</i> | 400 37 | 91 |
| | <i>Pfu</i> | 550 32 | 94 |
| B (T- cloning) | <i>Taq</i> | 57 21 | 73 |
| | <i>Pfu</i> | 29 32 | 47 |

표 3 PCR산물의 cloning 방법의 비교

*Taq*과 *pfu* polymerase를 사용한 PCR 산물 250 ng으로

(A) 평활화(TaKaRa blunting Kit), 인산화 한 후 *Hinc* II - 탈인산화 pUC118 50 ng과 연결반응을 하였다(TaKaRa Ligation Kit Ver.2).

(B) 50 ng의 pT7Blue(Novagen)와 연결반응을 실시하였다. 연결반응 약 21 μ l 중 10 μ l로 대장균 JM109를 형질전환하여, 1ml 중 200 μ l를 plating하여 얻어진 형질전환체 수를 나타낸다. 형질전환체는 β galactosidase의 활성에 의해 color selection 하였다. 백색 colony로 부터 분리한 plasmid에는 목적단편이 들어 있음을 확인하였다.

다. 이 single tube RT-PCR은 조작면에서 간편하지만, 잘 반응하지 않는 경우도 있어, 본래의 역전사효소를 이용한 2단계의 RT-PCR쪽이 보다 확실하다.

Taq polymerase와 *Tth* polymerase의 아미노산 서열은 극히 유사함에도 불구하고(88% identity)^{29,30)} 역전사활성이 명확히 다른 것은 DNA polymerase의 구조와 활성의 관계를 해석하는데 있어 흥미로운 사실이다.

(6) 기질 아나로그의 선택성

PCR의 응용범위가 넓어짐에 따라 목적에 따라 그에 맞는 다른 능력을 갖는 DNA polymerase가 요구된다. 예를 들면 반응액에의 contamination을 방지할 목적으로 dTTP를 대신하여 dUTP를 이용한 PCR을 실시한 후, uracil-N-glycosidase를 처리해 혼입 DNA를 분해하는 경우, oligonucleotide를 이용한 부위특이적 변이도입법을 위해서 주형 DNA에 dUTP를 삽입하는 경우³²⁾, 그리고 증폭절단을 hybridization의 probe로서 이용하기 위해 형광물질과 biotin을 부가한 dUTP 유도체를 기질로 사용하는 경우 등이다. 더욱이 GC가 풍부한 영역을 증폭하고 싶은 경우에는 dGTP 대신 d⁷cGTP(7-DEAZA-guanosine triphosphate)을 이용하면 성공하는 경우가 있다. 이처럼 천연의 A, G, T, C 이외의 염기를 가진 nucleotide를 삽입한 DNA 가닥을 합성하는 경우, *Taq* polymerase를 이용하는 것이 좋다. *Vent* polymerase와 *Pfu* polymerase에서는 이와 같은 DNA 가닥의 합성은 잘 되지 않는다. 다른 Pol I 형 효소도 사용이 가능하리라고 생각하지만 보고

된 바는 없다. 기질로서의 nucleotide만이 아닌 primer 서열 중에 G대신에 I(이노신)을 이용하는 경우가 자주 있다. 아미노산의 부분서열을 알고 그에 기초하여 primer를 합성할 때, 코돈의 중첩을 위해 혼합 primer를 합성해야 한다. 아미노산 배열에 따라서는 혼합의 정도가 높아져 바른 서열의 비율이 너무 낮아진다. 이 때 중첩해 있는 부분이 이노신을 이용하는 방법이 있다. 이 경우도 *Taq* polymerase를 사용해서 PCR을 실시하면 잘 증폭되지만 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase에서는 증폭되지 않는다. 3'→5' exonuclease 활성을 가진 α 형 효소는 기질 아나로그와 주형중의 이노신 대신 들어간 염기를 mismatch로서 제거해 버린다고 생각된다. 유일하게 3'→5' exonuclease 활성을 가진 *Ultma* polymerase를 사용했을 때 합성이 잘 된다는 보고가 있다³⁵⁾.

(7) LONG PCR

PCR로서 간단하게 목적의 DNA영역을 시험관 내에서 증폭할 수 있지만, 앞에서 언급한 바와 같이 증폭 서열의 충실성과 함께 PCR법이 갖는 또 하나의 큰 문제점은 증폭할 수 있는 DNA 영역의 길이에 제한이 있다는 것이다. 기존의 PCR에서 실제로 증폭할 수 있는 길이는 수 kbp 정도였다. α 형의 DNA polymerase를 이용한 경우 그 실용성은 더욱 내려가, 2 kbp 이하가 된다. 주형-primer에 따라서는 반응조건을 최적화하므로써 10 kbp 이상의 증폭이 가능한 경우도 있지만, 일반적으로 긴 단편 DNA의 증폭은 곤란하다. 94년, 워싱턴대학의 Barnes가 발표한 Pol I형 효소와 α 형 효소를 혼합해 PCR에 이용한 방법은 상기의 문제점을 해결할 수 있는 획기적인 것이다. *Taq* polymerase로 PCR 반응을 실시했을 때의 증폭길이에 제약을 받는 원인으로 3'→5' exonuclease 활성이 없어 잘못 읽은 경우에 3' 말단이 mismatch 되어 그 후의 합성이 저해되는 것이라 생각되므로 3'→5' exonuclease 활성을 갖는 *Pfu* polymerase와 *Vent* polymerase를 혼합하여 PCR을 실시해 보면 극히 효과가 있을 것으로 판단, 실제로 실험한 결과, 간단히 10 kbp 이상의 DNA 증폭이 가능하게 된 것이다(필자들도 이같은 발상으로 여러 가지 검토하였지만 적절한 혼합비를 찾을 수 없었다). 이 원리를 기초로, 제품화된 *TaKaRa Ex Taq* polymerase는 *Taq* polymerase에 비해 확실히 신장능력이 증가 증폭효율도 높아졌다(후술). 더욱이 *Ex Taq*에는 3'→5' exonuclease 활성이 포함되었기 때문에 정확성에서도 *Taq*에 비해 4배 정

도 더 좋아졌다. 현재는 이 원리를 이용한 긴 단편의 DNA 증폭용 kit로서 *TaKaRa LA*(long & accurate) PCR kit 등 몇몇의 제품이 시판되고 있다.

3. PCR의 실패

각 효소에 따라 PCR에 관한 성질이 어떻게 다른가에 대해서는 지금까지 서술해 온 바와 같이 반응조건과 DNA의 서

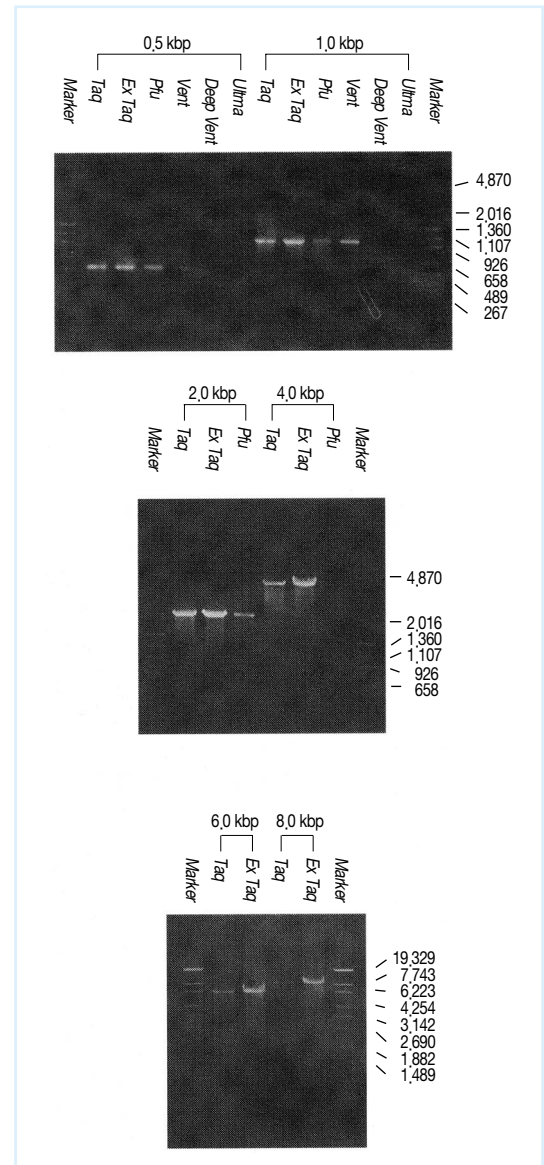


그림 3 DNA polymerase에 따른 PCR 증폭효율의 비교

λ -phage DNA 5 ng과 primer 각 10 pmol, dNTP 각 10 nmol을 50 μ l로 PCR하였다. DNA polymerase는 2.5 Unit 사용하고 첨부된 반응 buffer를 사용하였다. 94℃ 0.5분, 55℃ 0.5분, 72℃ 0.5분으로 25 cycles 실시한 후, 4 μ l를 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

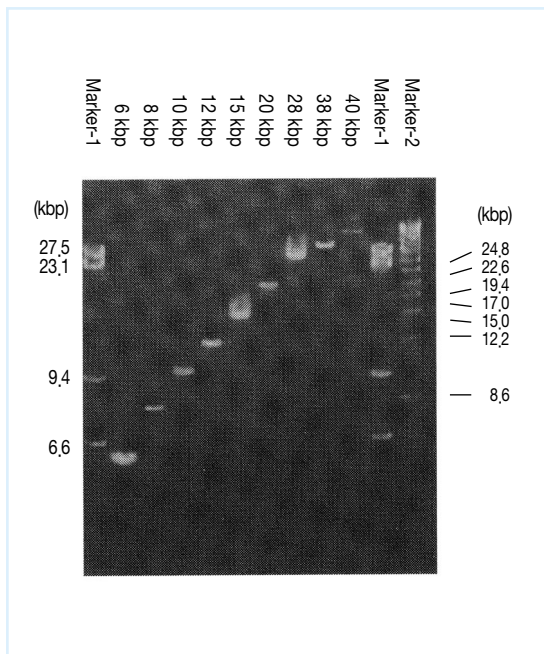


그림 4 Ex Taq polymerase에 의한 long PCR

그림 3의 실험과 같은 반응계에서 2.5 unit의 Ex Taq polymerase를 사용하여, 94℃ 1분간 변성 후 98℃ 10초, 68℃ 20분으로 30 cycles하였다. 반응액 4 µl를 0.4% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

열에 크게 영향을 받지만 하나의 예로서의 λ-phage DNA를 주형으로 이용해 현재 사용되고 있는 주요 DNA polymerase를 각 메이커가 첨부하는 buffer로 반응시켜 비교했다³⁷⁾.

효소로서는 Pol I 형은 Taq polymerase(TaKaRa)와 Ultra polymerase(Perkin Elmer)를 α형은 Pfu(Stratagene), Vent(NEB), Deep Vent polymerase(NEB)를 이용하고 혼합형으로서 TaKaRa Ex Taq을 이용한 λ-phage DNA를 주형으로서 0.5~8 kb까지 증폭영역을 달리하여 PCR을 실시하여 agarose gel 전기영동으로 비교했다(그림 3). 이 실험에서도 역시 α효소에서의 증폭효율이 나쁘고 증폭영역이 길어짐에 따라, Deep Vent, Vent, Pfu의 순으로 밴드가 검출할 수 없었다. 작은 길이에서는 Pfu polymerase가 좋지만 4 kb의 밴드는 검출할 수 없다. Taq과 Ex Taq은 8 kb의 밴드까지 검출할 수 있지만 증폭 효율에는 양자에 뚜렷한 차이가 있다. Taq은 이 반응계에서 15 kb까지 확인할 수 있지만 Ex Taq은 그림 4에 나타

낸 바와 같이 40kbp까지 증폭할 수 있다. 긴 증폭 DNA는 제한효소 절단 패턴에 의해 목적의 영역이 바르게 증폭되었는 지 확인하고 있다. 여기에 나타난 것은 공급회사가 첨부한 완충액을 사용해서 실험한 결과로서, 각 효소와 주형 DNA의 조합에 따라서는 좀더 적당한 반응조건이 있을지도 모른다. 특히 Mg^{2+} 농도는 민감하게 작용하므로(주형-primer DNA와 dNTP의 농도에 의해 반응액중의 이용가능한 Mg^{2+} 의 양은 변화한다) 최근 각 메이커는 첨부 buffer에서 $MgCl_2$ 을 제외하고, 별도의 tube로 공급해 각 실험자가 Mg의 적당한 농도를 검토할 수 있도록 하고 있다.

▶맺음말

지금까지 설명한 것과 같이 현재 여러 가지 내열성 DNA polymerase가 PCR에 사용되고 있지만 Taq polymerase 이외는 아직 사용예가 적고, 참고 데이터가 한정되어 있다. 또 같은 Taq polymerase라도 공급회사가 다수로 제조법의 차이에 따라 PCR에 관한 성능이 다를 때도 있다.

앞으로도 보다 뛰어난 PCR용의 효소가 개발될 가능성도 있다. PCR에 관한 라이선스가 Hoffman La Roche사로부터 몇몇의 메이커에 제공되고 있으므로 PCR의 제조, 판매의 권리를 취득한 메이커 사이에서 신규 효소의 개발이 본격적으로 전개될 전망이다. 이미 시작되고 있다고 말할 수 있다. 대장균 DNA polymerase가 그런 것처럼 Pol I의 효소는 균체내에서는 수복효소라고 생각되어 복제효소에 비하여 DNA의 신장능력이 낮은 것으로 생각된다. 따라서, 호열성 세균의 복제효소를 잘 활용한 Super LA-PCR의 개발이 예상되고 있다. 복제효소는 많은 subunit 구조로부터 구성되는 것으로 예상되어 그것들을 이용한 뛰어난 PCR계의 개발은 극히 어렵지만 경쟁은 이 분야로 향하고 있다. 필자들도 이제까지 많은 내열성 DNA polymerase를 단순히 단리하여, 몇몇에 대해서는 발표해 왔다^{14,38,39)}. 현재, 초호열성 고세균으로부터 이제까지 알려져있던 것과는 전혀 다른 신규 DNA polymerase를 분리하는데 성공하였다. 이 효소를 포함해서 개발 경쟁의 결과, 보다 뛰어난 또는 각종 사용 목적에 맞는 DNA polymerase가 개발되어 분자생물학의 발전에 공헌하고 인류의 진보에 큰 역할을 할 것으로 기대된다.



참고문헌

- 1) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. : *Science*, **239**, 487-491(1988)
- 2) Chien, A., Edgar, D. B., Trela, J. M. : *J. Bacteriol.*, **127**, 1550-1557(1976)
- 3) Wong, S. W., Wahl, A. F., Yuan, P.-M., Arai, N., Pearson, B. E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M. W., Wang, T. S.-F., : *EMBO J.*, **7**, 37-47(1988)
- 4) Wang, T. S.-F., Wong, S. W., Korn, D. : *FASEB J.*, **3**, 14-21(1989)
- 5) Ito, J., Braithwaite, D. K. : *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4045-4057(1991)
- 6) Braithwaite, D. K., Ito, J. : *Nucl. Acids Res.*, **21**, 787-802(1993)
- 7) Myers, T. W., Gelfand, D. H. : *Biochemistry*, **30**, 7661-7666(1991)
- 8) Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A., Mathur, E. J. : *Gene*, **108**, 1-6(1991)
- 9) Kong, H., Kucera, R. B., Jack, W. E. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 1965-1975(1993)
- 10) Uemori, T., Ishino, Y., Fujita, K., Asada, K., Kato, I. : *J. Biochem.*, **113**, 401-410(1993)
- 11) Koboev, O. K., Luchkina, L. A., Akhmedov, A. T., Bekker, M. L. : *J. Bacteriol.*, **145**, 21-26(1981)
- 12) Ishino, Y., Ueno, T., Miyagi, M., Uemori, T., Imamura, M., Tsunasawa, S., Kata, I. : *J. Biochem.*, **116**, 1019-1024(1993)
- 13) Ishino, Y. : *Am. Biotechnol. Lab.*, **10**, 47(1992)

PCR Primer

I. PCR Primer

II. PCR Primer의 설계

III. PCR Primer 분리, 정제 기술

I. PCR Primer

PCR로 유전자의 특정영역을 증폭하려면 primer가 되는 2종의 합성된 한가닥(single strand)DNA가 필요하다. Primer의 설계와 그에 대응하는 재조건 설정이 PCR의 성패를 결정한다고 해도 과언이 아니다. Primer의 설계상 주의점은 1) 길이, 2) primer간의 상보성, 3) GC 함량, 4) primer 내의 2차구조, 5) Tm 값, 6) 사용농도 등이 있으나, 현재는 primer 설계용 컴퓨터 프로그램도 시판하고 있다. PCR을 실시하려면 primer가 되는 2종의 합성 한가닥 DNA가 필요하다. Primer가 결합하는 위치에 따라 DNA 상의 어느 부분이 증폭되는지 결정된다. 또한 primer의 설계와 그 primer의 서열에 따라 PCR의 조건을 설정하여야 하며 이것이 PCR의 가장 중요한 요인이 된다. 표적 DNA의 상류(5')측의 sense strand(순방향), 하류(3')측의 antisense strand(역방향)의 primer를 선택한다. 본 고에서는 primer 설계상의 주의점 및 primer 제작용 소프트웨어 Oligo™에 관해서 서술한다.

1. Primer 설계상의 주의점

(1) Primer의 길이

Primer의 길이는 15~30 염기가 적당하고 20~25 염기가 바람직하다. 이 크기의 primer는 주형 DNA와 특이적으로 annealing하는데 충분하다. 단지 LA PCR(long and accurate PCR)의 경우는 30염기 이상의 primer가 보다 효과적이다.

(2) Primer 간의 상보성

2개간의 primer끼리 annealing하지 않도록 한다. 특히 3' 말단이 상보적인 primer가 되지 않도록 하면 primer의 dimer 형성에 의한 증폭 효율 저하의 위험성을 줄일 수 있다.

(3) GC 함량

GC 함량이 50% 전후로 설계하고 부분적으로 GC 혹은 AT-rich가 되지 않도록 한다. 또 primer의 3' 말단과 주형 DNA와 안정한 결합이 되도록 primer의 3' 부근이 AT-rich가 되지 않도록 한다.

(4) Primer 내의 2차구조

Primer 자신의 2차구조의 형성을 피하기 위하여 자기 상

보서열을 갖지 않도록 한다.

(5) Tm 값

2종류의 primer는 가능한 Tm 값이 근접하도록 설계한다. 몇 개의 primer 후보가 있을 경우는 통상 Tm 값이 높은 것을 선택한다. Annealing 온도는 primer Tm 값에 의존하지만 경험적으로 55~65℃에서 양호한 결과를 얻을 수 있다. Annealing 온도를 높이므로 mispriming을 방지할 수 있으므로 특이성 높은 PCR 반응을 실시할 수 있다.

(6) 농도

Primer의 농도는 최종농도 0.2~1 μM의 범위에서 사용한다.

2. Primer 설계용 컴퓨터 소프트웨어

최근에는 primer를 선택하기 위한 소프트웨어가 개발되어 시판되고 있기 때문에 이용하면 편리하다. 시판품으로 Oligo™, GENETYX 등이 있지만 본 고에서는 Oligo™에 관해서 대략 설명하기로 한다.

(1) Oligo™

미국 N.B.I.사(National Bioscience, Inc.)가 개발한 소프트웨어 Oligo™은 PCR, sequencing, 부위특이적 변이 도입, hybridization 등의 실험을 위한 primer나 probe 등의 oligonucleotide를 검색하기 위한 프로그램이다. Oligo™은 Tm 값, ΔG의 계산에 인접염기 빈도법을 이용하여 아주 정도가 높은 해석이 가능하므로 간단한 조작으로 각 실험에 최적인 primer를 검색할 수 있다.

(2) PCR Primer의 설계방법

Oligo™에서는 각종 primer 검색을 모두 자동적으로 실시된다. 예를 들면 PCR primer의 설계에서 지정된 범위내의 모든 oligonucleotide에 대해 다음의 검색을 실행한다.

① 지정된 안정성 내에 있을 것

통상 Tm 값이 전 oligonucleotide의 Tm 값이 최대치와 최소치 사이의 25~75% 내에 있는 것을 선택한다. 그림 1은 각 부위치마다 Tm 값이 plot 표시된 Oligo™의 주화면이다.

② 3개 이상의 반복 서열이 없고, 5개 이상 같은 염기가 속하지 않을 것

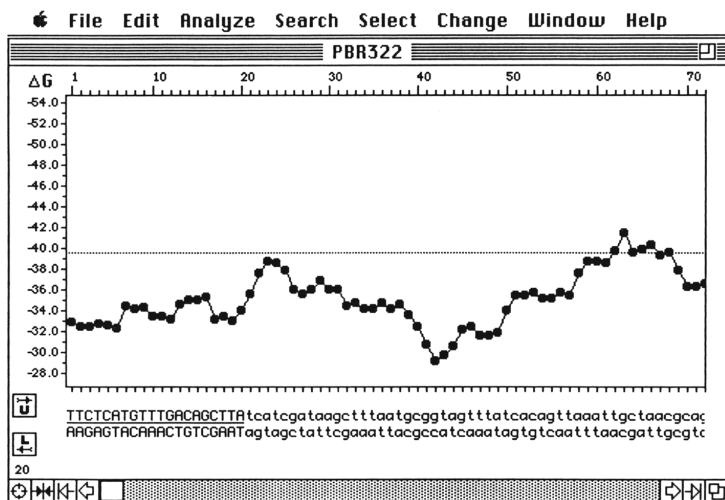


그림 1 Oligo™의 주화면

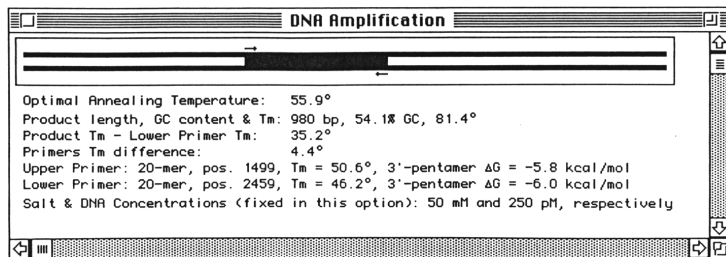


그림 2 PCR의 정보표시 화면

③ 특이성이 높을 것

Primer와 주형 DNA가 만드는 두가닥 DNA의 안정성 (duplex stability)을 해석한다. 전술한 바와 같이 효율이 높은 PCR을 위해 primer 3' 말단과 주형 DNA의 안정된 결합이 필요하지만 반대로 너무 안정되면 primer 특이성이 낮아지기 때문에 primer 3' 말단의 ΔG 가 너무 낮은 것은 제외한다.

④ Dimer와 hair pin 구조를 형성할 가능성이 없을 것

3염기 이상 수소 결합이 연속하는 스템(stem)을 형성할 가능성이 있는 primer는 제외한다.

⑤ 3' 측의 서열이 특이적일 것

주형 DNA의 다른 부위와 3' 측 7염기의 서열이 같은 primer는 제외한다.

이들 5가지 조건을 충족하는 두 개의 primer를 자동적으로 선택한다. 또 실험에 필요한 최적 annealing 온도 등의 정보를 표시한다. 그림 2는 PCR의 정보를 표시한 윈도우이다. 증폭하는 위치, 최적 annealing 온도, primer의 길이, Tm 값, GC 함유량 등의 정보를 표시한다. 이상의 조

건을 충족하는 primer는 대단히 효율이 높은 PCR primer가 될 수 있다.

II. PCR Primer의 설계

PCR을 실시하기 위해서는 primer가 반드시 필요하다. 그런데 PCR 관련 논문에는 primer의 염기서열은 기재되어 있으나 어떤 이유에 근거, 어떠한 방법론을 이용해서 염기서열을 결정한 것인지에 관한 기재가 거의 없다. 본 고에서는 primer를 디자인 하는데 있어서 고려해야 하는 각종 요소에 대하여 간단히 설명하였다.

특히 염기서열의 특이성을 검토하기 위하여 종래부터 이용하여 온 homology 검색이 primer에는 통용하기 어려운 점을 강조하고 대신 결합능(hybridizability)을 지표로 한 새로운 방법론을 소개한다.

PCR을 실제로 실시하는 경우 온도조건을 조절하는 기계(thermal cycler), 효소, 완충액 등과 함께 필수불가결한 요소가 oligonucleotide primer로 목적이 되는 유전자는 2종류의 PCR primer 사이에서 증폭된다.

최근 oligonucleotide의 합성에 소요되는 비용이 낮아져

염기서열 설계 그 자체에 중점을 두지 않고 다수 합성하여, 실험을 통해 증폭할 수 있는 pair를 찾는 경향이 있다. 그러나 일회성의 실험이 아니고 계속해서 같은 PCR을 해야 한다면 처음 단계의 설계에서 신중을 기해 안정적이고 재현성이 높으면서도 감도가 좋은 primer를 설계해야만 한다고 생각한다.

필자들은 이전부터 oligonucleotide의 probe와 primer의 염기서열을 어떻게 결정하면 좋은지를 중심으로 연구를 진행해 왔다. 특히 염기서열의 특이성을 강조하려고 하면 후술하는 바와 같이 종래의 homology 검색은 별로 도움이 되지 않는 경우가 많다. 그래서 범용성이 높은 컴퓨터 프로그램(HYB simulatorTM)^{5, 6)}을 개발하였다. 또한 probe와 primer의 디자인에 필요한 다수의 요소를 가미하여 PCR에 관해서는 비교적 만족할 수 있는 디자인 방법을 확립하였다. 본고에서는 PCR primer의 염기서열을 결정할 때에 고려해야만 하는 각종 인자에 대하여 개설하고자 한다.

1. PCR Primer 설계에 필요한 인자

(1) 결합능

Primer와 target 유전자 사이의 결합능력은 primer 디자인에 가장 기본적인 요소의 하나이다. DNA와 DNA 특이적 결합은 nucleotide의 Adenine(A)과 Thymine(T), Guanine(G)과 Cytosine(C)의 특이적인 결합에 의한 것으로 전자는 2개의 수소결합, 후자는 3개의 수소결합이므로, 필연적으로 A와 T가 많은 primer의 결합능력은 G와 C가 많은 primer보다 약하다. 또 항원항체반응과 Biotin, Avidin 결합의 경우는 특이성과 달라서, DNA의 경우 조건에 따라 특이성이 저하하여 mismatch가 있어도 결합하는 수가 있다. 따라서 특이성을 유지하기 위해서는 그 나름의 연구가 필요하다. 특히 PCR의 경우에는 2종류의 primer를 사용하기 때문에 제 1 primer가 특이적으로 target 유전자에 결합하는 조건이 제 2 primer에 따라

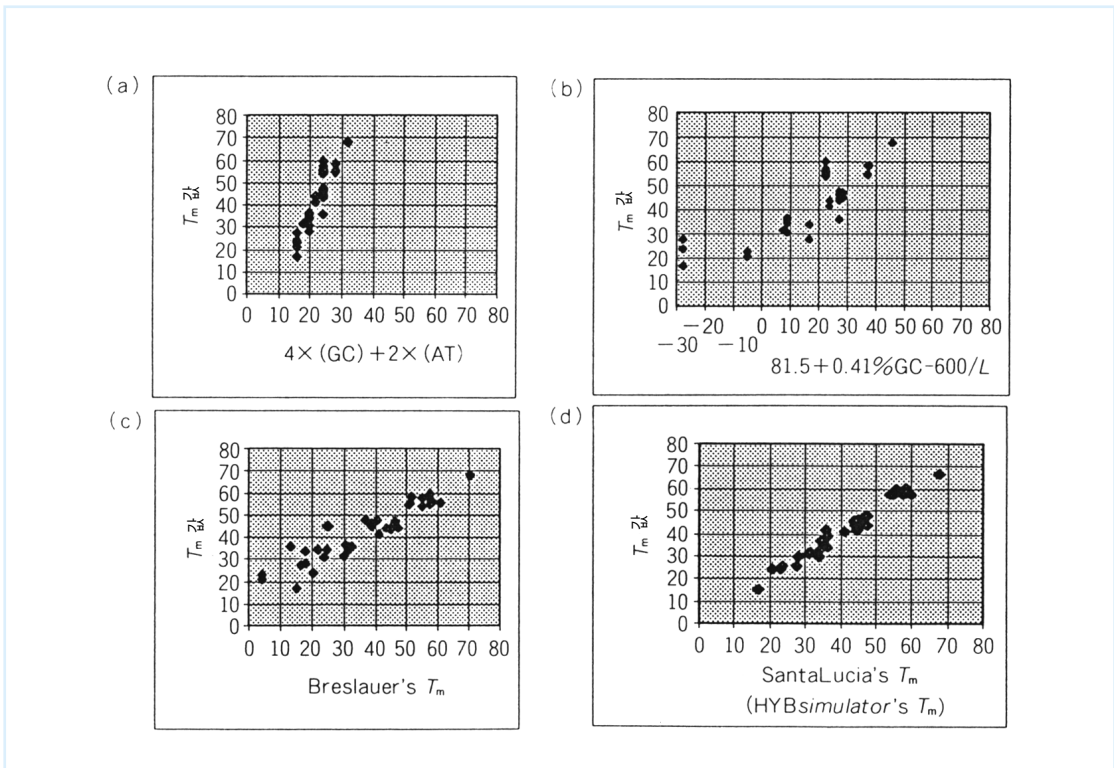


그림 1 T_m 예측식의 진보

38개의 oligonucleotide를 사용해서 증폭에 T_m 의 실측치, 횡축에 AT pair를 2℃, GC pair를 4℃로 한 경우의 계산 (a), $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 600/L$ (L: probe에 의한 계산식) (b), Breslauer 등에 의한 nearest neighbor법에 의한 예측식 (c), Santa Lucia 등에 의한 최근의 nearest neighbor법에 의한 예측식 (d)에 의한 T_m 값을 표시하였다.

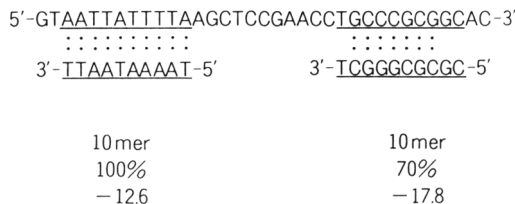
Oligonucleotide의 결합능력은 일반적으로 melting temperature(Tm)으로 나타낼 수 있다. Tm은 oligonucleotide와 DNA가 hybridize 되어진 것에서 열을 가함으로서 hybridization이 해리되어 50% oligotide로 hybridize되고 나머지 50%의 DNA가 해리될 때의 온도를 나타낸다. 이 값을 이론적으로 예측하는 계산식이 고안되어 있다. 가장 단순한 예측식은 AT pair가 2℃, GC pair가 4℃로 하여 그 합계를 oligonucleotide의 Tm으로 하는 것이다. 그러나 예측이 정확하지는 않다(그림 1a).

L은 nucleotide의 길이

$[\text{Na}^+]$: 1가의 이온농도

Primer의 Tm이 결정된 경우 PCR의 annealing 온도는 어떻게 설정해야 하는 것인가? 최종적으로는 실험을 통해 최적 온도를 모색해 나가야 하지만 다소 고려해야 하는 이론적 background를 간단히 개설한다. 이미 서술한 바와 같이 Tm 값은 50%의 oligonucleotide가 hybridize하고

즉 target 유전자에 대한 Tm과 cross hybridization하는 유전자에 대한 Tm의 차를 계산함으로써 그 primer의 target 유전자에 대한 특이성의 정도를 알 수 있다(그림 3a). 또 각 Tm마다 cross hybridization될 가능성이 있는



Primer 2는 primer 1보다도 여기에 표시한 유전자에 대한 homology는 70%로 낮지만 GC 함량이 높기 때문에 결합능력이 높다.

유전자의 수를 표시하는 것도 특이성 판정에 도움이 된다 (그림 3b). 또한 대상이 되는 database를 구분함으로써 어떤 것에 대해 특이성이 있는지를 명확히 하는 것도 중요하다. 또 primer의 염기서열 특이성을 향상시킬 간의 수단이 다. PCR의 과정에서 primer는 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 DNA 합성이 진행되어 가는데 이 3' 말단에 GC 함유량이 많거나 3' 말단이 부분적으로 Tm값이 높으면 primer의 3' 부분이 target 유전자와 결합하는 것만으로 DNA 합성이 시작되어 버린다. 즉 염기서열의 특이성이 3' 말단이 짧은 부분 염기서열만으로 결정되므로 당연히 특이성이 저하된다. 따라서 3' 말단의 GC 함유량을 낮도록 설계한다. 더욱이 대상이 되는 유전자 database 중에서 5 mer와 6 mer의 짧은 염기서열의 빈도를 계산해서 빈도표를 작성해 두고

primer 3' 말단측의 짧은 부분의 염기를 이 빈도표에 맞추어 보아 빈도가 적은 것을 선택하는 경우도 있다. 최근 PCR 프로그램에는 이 기능이 부가되어 있는 경우가 많다.

(3) 2차구조

PCR에 사용하는 primer는 모든 염기가 목적하는 유전자에 결합하는 것을 전제로 하나 primer 자신이 hair pin 구조를 형성해 버리면 목적 유전자에 결합할 수 없거나 다른 유전자와 결합해 버려 false positive의 원인이 되는 경우가 있다. 다행히 PCR 반응 중에는 열에 의한 변성 과정이 존재하여 그 과정에서 hair pin 구조는 해소되기 때문에 hair pin이 그만큼 중요시되지 않는 경우가 많다. 그러나 PCR 반응액 중 primer 농도는 target 유전자의 농도에 비

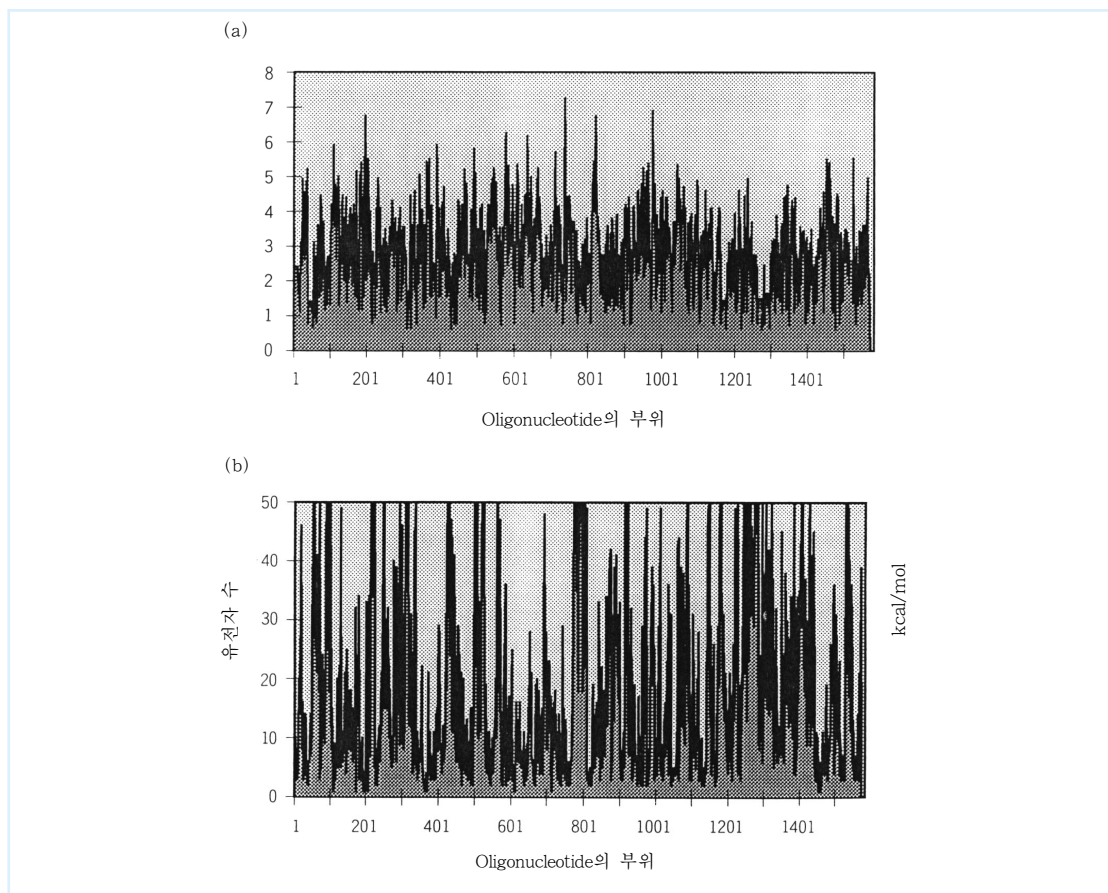


그림 3 각 primer의 특이성 표시

Primer 후보는 target 유전자의 각 부위(횡폭)에 같은 결합능(ΔG)을 갖도록 제작하여 그 각각에 대해서 유전자뱅크 중의 전유전자에 대한 결합능력을 HYB simulator로 계산하였다. (a) target 유전자에 대한 ΔG 와 cross hybridization한 유전자 중 최대의 ΔG 와의 차이를 종축에 나타냈다. 이 값이 큰 만큼 특이성은 높아진다. (b) target 유전자에 대한 ΔG 에서 5 kcal/ml 약해진 경우와 cross hybridization할 가능성이 있는 유전자 중의 유전자를 종축에 나타냈다. 이 값이 클수록 특이성은 감소한다.

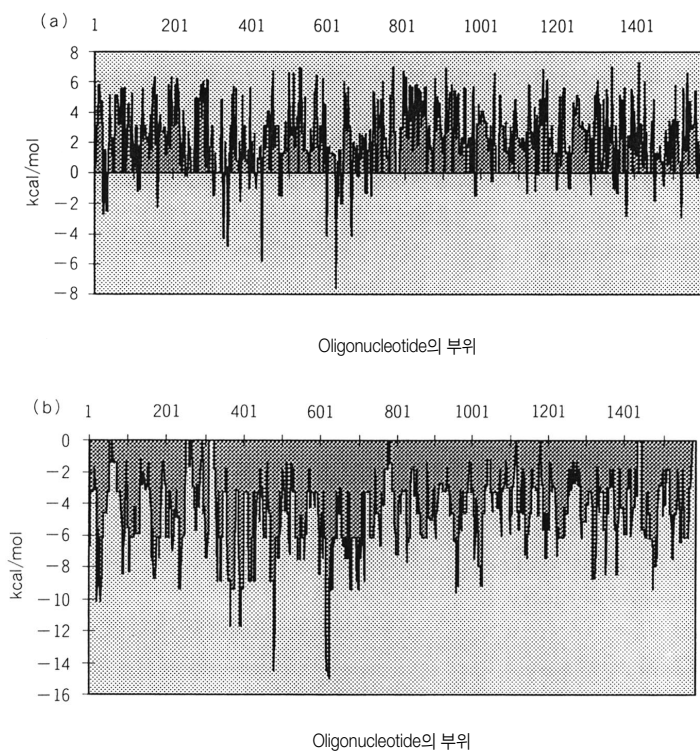


그림 4 각 Primer의 hair pin 구조와 dimer 형성의 가능성

Primer 후보를 target 유전자의 각 부위(횡축)에서 같은 결합능력(ΔG)이 되도록 제작하여 각각에 대해 hair pin 구조를 만드는 에너지(Kcal/mol) (a)와 dimer를 만드는 에너지(Kcal/mol) (b)를 HYB simulator로 계산하여 종축에 표시하였다. 마이너스치가 크게 되는 만큼(아래쪽을 향하는 만큼) hair pin과 dimer를 만들기 쉬워진

하면 압도적으로 많기 때문에 primer의 hair pin은 PCR 감도를 저하시키는 원인이 된다.

Oligonucleotide 자체의 hair pin 구조를 형성할 가능성은 일반적으로 kcal/mol로 계산된다. 그림 4(a)에 target 유전자의 각 부위에서 일정 T_m 이 되도록 추출한 oligonucleotide의 hair pin 구조를 나타냈으나 primer에 따라 hair pin 구조의 제작 가능성이 크게 다르다는 것을 알 수 있다. 한편 표적유전자 자체도 hair pin 구조를 형성시킬 가능성이 있다. 특히 한가닥 DNA나 cDNA가 주형인 경우 이들 DNA에 primer가 hybridize하는 것보다도 앞에 DNA 자체가 hair pin 구조를 형성해 버리면 primer가 hybridization할 수 없다. Primer가 먼저 hybridization 하면 그 중간부위에 있는 hair pin 구조는 DNA 합성 과정에서 해소되기 때문에 문제가 되지 않는다. 그래서 적어도 primer가 hybridization하는 위치는 hair pin 구조를 만들기 어려운 부분이 이상적이다. 그러나 실제로는 primer가 대량

으로 존재하고 primer 쪽이 표적 유전자에 비해 작은 분자이기 때문에 표적유전자가 hair pin을 형성하기에 앞서 primer가 hybridization할 가능성이 훨씬 높다. 따라서 표적 유전자의 hair pin은 그다지 문제가 되지 않는 경우가 많다.

(4) Primer의 상호작용

PCR 반응액 중의 primer의 농도는 표적 유전자의 농도와 비교하여 압도적으로 많기 때문에 primer간에 서로 hybridize하기 쉬운 구조를 갖고 있으면 이른바 primer dimer를 형성하여 target 유전자와의 hybridization이 대폭 억제된다. 이 primer dimer에는 sense간, antisense간 및 sense와 antisense간의 3종류가 있다. 한편 sense간과 antisense간에서는 hybridize하지 않는 것으로 착각할 수 있는데, 예를 들어 5'-AGCT-3'은 반대방향(3'-TCGA-5')에 상보성이 있으므로 충분히 dimer를 형성한다. 이들 dimer의 형성 가능성은 계산으로 쉽게 예상할 수 있다(그림 4b).

(5) 증폭산물의 위치

Cloning 등의 기초적인 실험의 경우 예를 들면 전단백질 정보영역 염기서열을 증폭하는 것처럼 PCR 산물의 위치는 실험의 목적에 따라 결정된다. 그러나 PCR을 이용해서 특이적인 유전자의 발현을 조사할 경우에는 PCR 산물의 위치에 관한 한정이 적어 primer의 설계에 융통성이 있다. 일반적으로 GC가 많은 부분을 PCR로 증폭하는 것은 어려워 상당히 특별한 know-how가 필요하다. 그래서 미리 표적유전자에 GC가 많은 부분의 존재여부를 확인하여 GC가 많은 부분이 증폭되지 않도록 primer를 설계하는 것이 바람직하다.

PCR 산물의 위치와 동시에 PCR 산물의 크기도 중요한 요인이다. 일반적으로 PCR 산물이 짧으면 짧을수록 증폭이 확실하고 감도도 증가한다. 길이가 1000 bp를 초과하면 더욱 특수한 know-how(long PCR 참조)가 필요하다. 최단 길이는 primer dimer를 구별할 수 있는 길이인 가능하지만 이 경우 agarose gel 전기영동보다도 조작이 복잡한 acrylamide gel 전기영동이 필요하므로 그다지 일반적은 아니다.

(6) Primer의 길이

실험에 따라 10 mer 전후의 짧은 경우로부터 40 mer를 초과하는 긴 primer를 사용한 경우까지 다양하다. 기본적으로 sense와 antisense가 같은 T_m 값이 된다면 같은 길이로 할 필요는 없다. 길이가 길면 특이성이 증가한다고 오해하는 경우가 많지만 너무 길면 primer의 T_m 이 annealing 온도보다 높아지기 때문에 mismatching을 갖는 잘못된 hybridization이 증가하여 특이성이 저하한다. 반대로 짧아지면 그만큼 비슷한 염기서열이 반응액 중에 존재할 확률이 높아 mismatching 가능성이 커진다. 단순히 human genome 유전자 총량으로부터 계산하면 17 mer(4의 17승 조합)까지는 human 유전자의 어딘가는 같은 서열이 있을 가능성이 존재한다. PCR의 경우 2종류의 primer와 반응해야만 되기 때문에 이론적으로는 17 mer로 충분하지만 일반적으로 20 mer 전후의 primer를 가장 많이 사용한다.

2. 특수한 PCR에 대한 Primer 설계

(1) Nested PCR

Nested PCR은 외측 primer와 내측 primer를 사용하여

2단계로 PCR을 시행하는 방법이다. 외측 primer를 사용한 PCR 후, DNA를 정제해서 primer를 제거하면 특별히 primer 설계상의 문제점은 없다. 그러나 2단계 PCR 간에 외측 primer를 제거하지 않으면 primer 설계 단계에서 4종류의 primer 상호작용을 확인해 둘 필요가 있다.

(2) Multiplex PCR

Multiplex PCR로는 복수의 primer 쌍을 동시에 사용하여, 복수의 표적 유전자를 같은 반응액 중에서 증폭하는 방법이다. 이 경우 복수 primer의 상호 작용을 계산하여 primer가 dimer를 형성하지 않는 primer 조합을 만들어야 한다. 또 복수의 PCR 산물 크기를 agarose gel에서 충분히 구별할 수 있어야 한다.

(3) Long PCR

PCR로 1,000 bp 이상 유전자를 증폭하는 경우 primer가 PCR 산물 자체에 결합하지 않도록 하여야 한다. 만약 primer 3' 부분이 이 PCR 산물에 부분적으로 결합하면 DNA 합성이 시작되어 짧은 PCR 산물을 우선적으로 생성한다. 이런 경우는 긴 PCR 산물의 증폭을 기대할 수 없다.

(4) Competitive PCR

일부러 중간부분을 제거한 유전자를 미리 제작하여 같은 primer를 이용하여 검체 중의 target 유전자와 이 짧은 인공 유전자를 동시에 PCR로 증폭하여 양자의 PCR 산물을 정량 비교함으로써 검체 중의 target 유전자의 양을 정량한다. 이 경우 인공 유전자의 탈락부위와 primer와의 사이에 새로운 cross hybridization이 발생하지 않도록 해야 한다.

(5) PCR Cloning

PCR 후에 증폭한 유전자를 간단히 subcloning 할 수 있도록 primer의 5' 말단에 제한효소의 인식서열을 부가하여 PCR을 실시하는 방법이 널리 사용되고 있다. 이 경우 제한효소서열의 부가가 primer 자체의 특이성을 저하시키지 않고 또한 hair pin이나 dimer를 형성하지 않도록 하여야 한다.

(6) PCR에 의한 돌연변이의 검출

이미 언급한 바와 같이 primer의 3' 부분의 hybridization 만으로 합성이 개시되므로 mismatch가 primer의 중간부위 또는 5' 말단에서 일어나면 돌연변이체의 식별이 어렵

다. 일반적으로는 3' 말단에 mismatch가 있으면 DNA의 합성이 일어나기 어려우므로 이 부분에 primer를 설정한다. 이때 mismatch의 부분을 sense primer에 부가할 것인지 antisense primer에 부가할 것인지가 문제가 된다. 필자들은 primer의 mismatch의 유무에 따라 T_m 이 어느 정도 변하는지 sense와 antisense의 양쪽으로 계산하여 커다란 쪽을 선택한다. 또 3' 말단부분의 GC 함량이 많으면 만약 3' 말단에 mismatch가 있어도 3' 말단 부분이 DNA 합성을 개시할 만큼의 강한 hybridization 강도가 된다. 따라서 3' 말단의 GC 함량이 높지 않도록 primer의 mismatch를 도입한다. 또 3' 말단부분의 hybridization의 강도가 저하하도록 일부러 3' 말단과 2번째 염기에 mismatch를 도입해 놓는 경우도 있다. 대상이 유전자 질환으로 genome을 검체로서 사용하는 경우에는 돌연변이체 유전자의 존재는 100%(Homo), 50%(Hetero), 0%(정상)이므로 아주 높은 특이성을 요구하지는 않는다. 그러나 대상이 암 등의 후천성 질환의 경우에는 정상세포 중에 아주 적게 존재하는 돌연변이체의 유무를 판정하여야 하므로 높은 특이성을 요구한다. 이 때는 mismatch의 존재가 최대한 hybridization에 영향을 미치도록 아주 짧은 primer(10-20 mer)를 사용하는 것도 고려한다.

(7) 공통 Primer

유전자 family에 공통인 염기서열의 부분에 primer를 설정할 수 있으면 한번의 PCR에 그 유전자 family의 존재를 검토할 수 있다. 예를 들면 어떤 type의 mycobacteria인가는 불명이나 mycobacteria의 감염여부를 공통의 primer에 의한 PCR로 진단할 수 있다. 또 어떤 종의 유전자 family로부터 새로운 유전자의 발견이나 cloning이 가능하다. 이런 경우에는 미리 대상이 되는 유전자 family로부터 database를 구축할 필요가 있다. 또한 복수의 database를 사용함으로써, 예를 들면 각종 mycobacteria에 공통이고(mycobacteria database 사용), 그러면서도 다른 bacteria와는 최대한 다르며(GenBank의 bacteria database 사용), 사람의 다른 유전자와도 공통성을 갖지 않는(GenBank의 primate database 사용)보다 복잡한 primer의 설정도 가능하게 되었다.

III. PCR Primer 분리, 정제 기술

핵산의 분리에는 종래부터 agarose나 acrylamide 전기

영동법을 일반적으로 사용하여 왔다. 화학 합성 한 oligonucleotide의 분리 정제에는 HPLC(High performance liquid chromatography)를 사용하는 것이 일반적으로 한번에 수 OD분의 oligonucleotide를 정제할 수 있다. 간이 정제법으로 역상계 컬럼(oligonucleotide purification cartridge column: OPC)법이 보급되어 있다. 암모니아 처리 후의 oligonucleotide를 전량 cartridge에 흡착한 후 용출시키는 방법으로 단시간에 다량을 정제할 수 있다. 또 긴 것이나 미량의 nucleotide의 분석에는 capillary gel 전기영동법도 사용하고 있다.

(1) Oligonucleotide의 정량

분리정제에 앞서 oligonucleotide의 정량에 대하여 설명한다. PCR을 실시하는 경우, primer의 양은 수 pmol을 사용하나 이를 천평 등으로 측정할 수 없다. 통상 1 ml 용액 중 oligonucleotide의 260 nm의 흡광도로부터 OD_{260} (optical density) units/ml를 측정한다.

$A = \epsilon c l$ (A : 흡광도, ϵ : mol 흡광광도, c : mol 농도 (mmol/ml), l : 광로장(1 cm))의 식으로 $c = A / \epsilon \cdot l = A / \epsilon$ 즉 흡광도로부터 mol 농도를 구할 수 있다. 1 잔기당 mol 흡광광도를 약 10,000으로 하여 대강의 primer 양을 계산할 수 있다. 또 oligonucleotide의 양은 1 OD_{260} unit 당 약 33 μg 으로 기억하면 좋다.

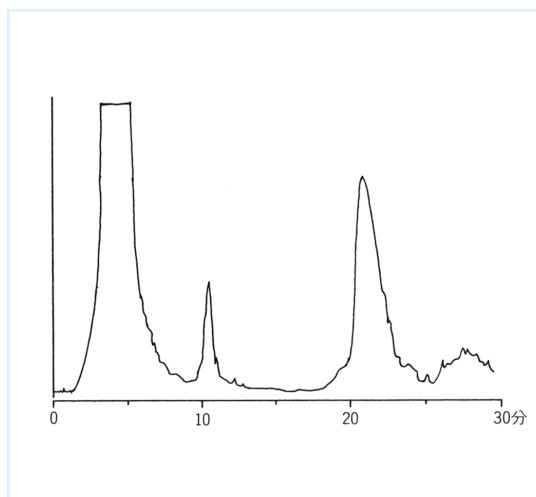


그림 1 긴가닥 nucleotide의 정제

시료: DMTr-40 mer, column: Capcell Pak SG-300(6.0×300 mm), 이동도: (A) 5% CH₃CN 0.1 M TEAA buffer, 농도기울기: 30%(B)-80% (B) (20분), 유속: 1.0 ml/분, 온도: 40℃, 검출파장: UV(254 nm)

(2) HPLC

Oligonucleotide를 분리하는 방법으로서 역상 HPLC column 또는 음이온 교환 HPLC column을 이용한다.

A. 역상 분배 Chromatography(RP-HPLC)

고정상으로는 silicagel을 담체로한 화학 결합형이 자주 이용되어 특히 oligonucleotide의 분리에는 직쇄상의 18개의 탄소가닥을 갖는 octadecyl기를 화학결합한 입자경 5 μ m 세공경이 100~300Å의 전다공형 octadecylan(ODS)겔 충전제가 주로 사용되고 있다.

통상 염기부분의 소수성을 이용한 column에 보지시키나 화학합성 후의 oligonucleotide의 정제는 5' 말단의 수산기의 보호기인 DMTr기의 강한 소수성을 이용하여 암모니아 처리에 의한 capping이 떨어진 5' 말단이 free 수산기를 갖는 짧은 nucleotide와 분리하는 방법을 사용한다.

긴 nucleotide의 정제도 주로 이 방법을 이용하여(그림 1) 역상 HPLC 분취 후 DMTr기를 80% acetate으로 제거하여 재역상 HPLC등으로 정제한다.

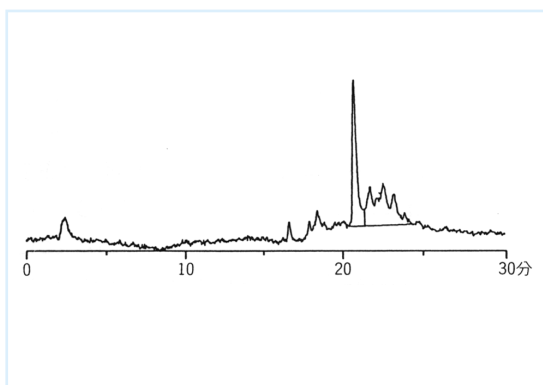


그림 2 Fluofix™

시료 : 28 mer CGAATTCGAGCTCGAGATGAAGCTCTTT, column: FLUOFIX 300N(4.6×150 mm), 이동도: (A) 50mM ammonium acetate (B) (A)/MeCN=50/50, 농도기울기: 0% (B) ~10% (B) (30분), 유속: 1.0 ml/분, 온도: 실온, 검출파장: UV(254 nm)

이동상은 점도가 낮은 휘발성의 용제, 예를 들면 물-acetonitril, 물-methanol 계를 사용하여 pH 조정용으로 tetraethyl ammonium acetate(TEAA) 완충액을 주로 사용한다. 이는 tetraethyl 암모늄염이 DNA의 인산부와 이온대를 형성한 DNA의 소수성을 높여 column과의 보지성을 강하게 하여 분해능을 높이는 것이다.

최근 실리카겔 표면을 불소계 cylan 화합물을 수식제로 한

칼럼(Fluofix™[NEOS])도 시판되고 있다. 역상 분배계와 이동도가 같고, 비교적 높은 분해능을 갖고 있어 oligonucleotide 분리용으로서도 사용 가능한 column이다(그림 2).

B. 음이온 교환 Chromatography(DEAE-HPLC)

이온교환 chromatography는 이온성 물질에 분리분석을 목적으로 종래부터 사용되어 온 방법이다. DNA는 염기-당 인산의 반복구조이기 때문에 길이가 한 잔기 길어질 때마다 한개의 인산이 증가한다. 즉, 음이온교환 chromatography는 음이온의 인산기와 이온적 상호작용에 의하여 보지가 달성되므로 oligonucleotide를 길이에 따라 분리할 수 있는 특징을 갖고 있다. 용출액의 음이온의 염농도를 높여감으로서 짧은 가닥으로부터 긴 가닥의 순으로 용출할 수 있어 수 잔기 짧은 oligonucleotide의 분리에는 역상 분배법 보다는 효과가 있다.

DNA 정제용의 음이온 교환제로서 Diethylaminoethyl(DEAE)기를 실리카겔 담체에 화학결합한 것을 사용하고 있다. 또 TSK-gel DEAE-NPR(TOSO)와 같은 세공이 없는 비다공형 충전제에 의해 고속으로 높은 분해능을 갖는 컬럼도 있다. 이동상으로서 실리카겔 담체와 oligonucleotide와의 비특이적 흡착을 막는 목적으로 소량의 acetonitril 등의 유기용제를 섞어 formic acid 암모늄의 form산 이온이나 NaCl의 염소이온 등 염의 음이온의 농도 기울기에 의해 oligonucleotide를 용출한다.

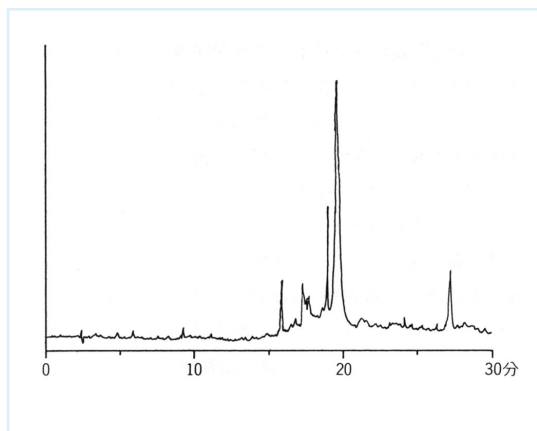


그림 3 TSK-gel DEAE-NPR

컬럼 : TSK-gel DEAE-2 SW(4.6×250 mm), 이동상 (A) 20% CH₃CN 0.2 M HCOONH₄, (B) 20% CH₃CN 0.1 M HCOONH₄, 농도기울기: 30% (B) ~70% (B) (20분), 유속: 0.8 ml/분, 온도 : 40℃, 검출파장: UV(254 nm)

단, 이 때 염을 사용하기 위해 분리정제 후, 역상의 cartridge 컬럼이나 Sephadex G-25 겔 여과 컬럼(NAP-10(Pharmacia)) 등을 사용한 탈염 과정이 필요하다. 겔 여과 컬럼의 경우 용출액을 농축할 필요가 있고, 너무 농축하면 염기가 석출하기 때문에 역상 cartridge 컬럼이 조작에 간편하다.

C. 역상 Cartridge 컬럼(Oligo-Pak™[Perseptive], OPC™[Perkin-Elmer], Sep-Pak[Waters] 등)

Octadecysilan(ODS) 겔이 채워진 cartridge 컬럼은 입자경이 HPLC 컬럼과 같이 가늘고 균일하지 않다. 그렇기 때문에 반복 사용에는 적당하지 않다. 분리법은 역상분배법과 같다. 각 메이커로부터 역상 cartridge 컬럼이 판매되고 있으나 최근 암모니아 처리후의 용제를 그대로 apply할 수 있는 cartridge도 있다. 사용방법은 1회용 주사기와 아래의 용제가 있으면 아주 간단히 가능하다. Flash는 빈 주사기로 공기를 보내 cartridge중에 남아 있는 용제를 제거한다. 또, 완충액에는 0.1 M TEAA 이나 0.05 M TEAB(tetraethyl 암모늄 중탄산염) 완충액 등을 사용한다. 시료는 화학합성 후의 DMTr기가 붙은 oligonucleotide를 암모니아 처리한 것을 사용한다.

Acetonitril 5 ml에 의한 cartridge의 세정

↓ flash

증류수 5 ml를 첨가하여 acetonitril을 추출

↓ flash

사용하는 완충액 10 ml에 의해 평형화한다.

↓

Ammonia 처리 후의 시료를 증류수로 희석하여 apply 한다.

↓

증류수 또는 완충액 10 ml를 흘려 넣는다.

↓

25% methanol/완충액 10 ml로 짧은 nucleotide 제거

↓ flash

증류수 10 ml 첨가하여 methanol을 추출

↓

2% Trifluoroacetic acid(TFA) 5 ml × 2회로
Oligonucleotide의 DMTr기 제거

↓ flash

물 10 ml를 첨가하여 TFA를 추출

↓ flash

30% methanol/완충액 3 ml에 의해 목적의 nucleotide 용출

이상의 조작에 의해 한개의 cartridge 컬럼으로 10 OD Unit 이상의 oligonucleotide를 얻을 수 있다. 또 정제시간도 HPLC로 정제하는 것에 비해 아주 짧다. PCR에 있어서 primer로 사용하는 것이라면 cartridge 정제로 충분한 순도를 얻을 수 있다.

D. Capillary Gel 전기영동

진 가닥 nucleotide의 순도 확인은 polyacrylamide gel 전기영동 대신에 최근 capillary gel 전기영동이 사용되고 있다. Capillary tube에 polyacrylamide gel을 채워 변성제가 들어 있는 완충액으로 전기영동하면 길이 1잔기의 차이로도 검출할 수 있다. 정도가 높은 capillary acrylamide gel의 단점은 열화가 빠르고 반복사용이 불가능한 것이다. 최근 capillary 안에 완전히 다른 polymer를 채운 tube가 개발되어 반복사용할 수 있는 tube를 사용한 전기영동 장치가 개발되었다.



참고문헌

- 1) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. : *Science*, **230**, 1350-1354(1985)
- 2) Wilbur, W. J., Lipman, D. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 726-730(1983)
- 3) Smith, T. F., Waterman, M. S. : *Adv. Appl. Math.*, **2**, 482-489(1981)
- 4) Pearson, W. R., Lipman, D. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2444-2448(1988)
- 5) Mitsunashi, M., Cooper, A., Ogura, M., Shinagawa, T., Yano, K., Hosokawa, T. : *Nature*, **367**, 759-761(1994)
- 6) Mitsunashi, M., Hosakawa, T. : *일본임상*, **52**, 530-541(1994)
- 7) Bolton, E. T., McCarthy, B. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 1390(1962)
- 8) Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., Marky, L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3746-3750(1986)
- 9) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. :

- Science*, **37**, 170-172(1985)
- 10) Tanaka, T., Letsinger, R. L. : *Nucl. Acids Res.*, **10**, 3249-3260(1982)
 - 11) Ikehara M. 단백질, 핵산, 효소 **26**, 531-537(1981)
 - 12) Michelson, A. M., Todd, A. R. : *J. Chem. Soc.*, 2632(1955)
 - 13) Khorana, H. G. : *Pure. Appl. Chem.*, **17**, 349-381(1968)
 - 14) Letsinger, R. L., Ogilvie, K. K. : *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4801-4803(1967)
 - 15) Letsinger, R. L., Lunsford, W. B. : *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3655-3661(1976)
 - 16) Matteucci, M. D., Caaruthers, M. H. : *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3185-3191(1981)
 - 17) Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J., Koster, H. : *Nucl. Acids Res.*, **12**, 4539-4557(1984)
 - 18) Froehler, B. C., Matteucci, M. D. : *Tetrahedron Lett.*, **27**, 467-472(1986)
 - 19) Adams, S. P., Kavka, K. S., Wykes, E. J., Holder, S. B., Galluppi, G. R. : *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 661-663(1983)
 - 20) Schaller, H., Weimann, G., Lerch, B., Khorana, H. G. : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3821(1963)
 - 21) Buchi, H., Khorana, H. G. : *J. Mol. Biol.*, **72**, 251(1972)
 - 22) Smith, M., Rammner, D. H., Goldberg, I. H., Khorana, H. G. : *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 430(1962)
 - 23) Fritz, H. J., Belagaje, R., Brown, E. L., Fritz, R. H., Jones, R. A., Lee, R. G., Khorana, H. G. : *Biochemistry*, **17**, 1257-1267(1978)
 - 24) Gait, M. J., Matthes, H. W. D., Singh, M., Sproat, B. S., Titmas, R. C. : *Nucl. Acids Res.*, **10**, 6243(1982)
 - 25) Dahl, B. H., Nielsen, J., Dahl, O. : *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1729-1743(1987)
 - 26) Hayakawa, Y., Uchiyama, M., Noyori, R. : *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4191-4194(1986)
 - 27) Kato, K : 속 생화학 실험강좌 II 핵산 I 분리정제. pp147-171, 동경화학동인(1991)
 - 28) Newton, C. R., Greene, A. R., Heathcliffe, G. R., Atkinson, T. C., Holland, D., Markham, A. F., Edge, M. D. : *Anal. Biochem.*, **129**, 22-30(1983)

PCR용 주형 DNA의 조제

I. 주형 DNA의 조제

II. 임상 검체에서의 주형 DNA 조제

III. 세포 진단 검체로부터의 조제

I. 주형 DNA의 조제

PCR을 위한 DNA의 조제과정에서 중요한 점은 시료 간 또는 다른 DNA의 혼입을 최대한 억제하고, 반응을 저해하는 물질을 제거하는 것이다. 종래에 사용하던 고분자 DNA의 조제법이 PCR용 주형 DNA의 조제법에도 활용된다. 그러나 목적에 따라서는 DNA의 순도 및 회수량은 다소 낮지만, 주형으로서 기능할 수 있는 정도로 간편하게 추출하는 간이 조제법도 유용하다.

DNA 조제법은 그 목적과 시료의 상태 등에 따라 여러가지 면에서 다양하다. 여기서는 동물세포와 조직으로부터의 DNA 추출법을 소개하는데, 유전자 library의 작성에도 사용할 수 있을 정도의 고분자 DNA를 조제하는 proteinase K/phenol 추출법은 다소 노력과 시간이 필요하지만, PCR용 주형 DNA의 조제법의 근간이 된다. 한편 목적에 따라서는 DNA의 순도 및 회수량은 다소 낮지만 주형으로서 기능할 수 있는 정도로만 간편하게 추출하는 간이 조제법도 있다. PCR을 위한 DNA 조제과정에서 중요한 것은 시료간 또는 다른 DNA의 혼입을 절대적으로 막는 것과 반응을 저해하는 물질을 제거하는 것이다.

1. Proteinase K/Phenol 추출법^{1, 2)}

(1) 개요

SDS로 세포를 용해함과 동시에, ribonuclease로 RNA를 분해한다. 그 다음 단백질을 proteinase K로 분해하고 추출액 속의 단백질을 phenol 추출법으로 제거한다. 단백질이 제거된 추출액에 에탄올을 첨가하여, DNA를 침전하여 회수한다.

(2) 시약과 용액

- ① 추출 buffer(10 mM Tris-HCl(pH8.0), 0.1 M EDTA(pH 8.0), 20 μ g/ml pancreas ribonuclease, 0.5% SDS)(10 mM EDTA로도 충분한 DNA를 얻을 수 있다)
- ② 액체질소
- ③ 20 mg/ml proteinase K 용액(이온교환수에 녹여서 조제한 후 분주하여 동결보존하고, 사용시 용해한다)
- ④ 0.5 M Tris-HCl(pH8.0)-saturated phenol
- ⑤ 10 M Ammonium acetate

- ⑥ Ethanol 및 70% ethanol
- ⑦ TE 완충액(10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA)

(3) 배양세포에서 DNA 추출

- ① 10 cm plate 한개분의 접착세포(10^7 개)의 경우, PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 plate 표면에서 물리적으로 유리시켜 15 ml polypropylene tube에 옮긴다. 세포를 4℃에서 1500×g, 5분간 원심분리하여 상청액을 제거한 침전물을 모아 동결보존하거나 다음 단계로 진행한다.
- ② 침전세포에(동결세포의 경우에는 용해 후) pancreas ribonuclease를 함유하는 추출 buffer 2 ml를 첨가, 충분히 현탁하여 37℃에서 1시간 반응시킨다.

(4) 조직에서 DNA 추출

- ① 신선한 조직 또는 동결조직의 단편(100 mg)을 스테인레스 용기에 옮겨, 소량의 액체 질소를 첨가하여 완전히 재동결한 후, 액체질소에 적신 채로 스테인레스봉 끝으로 두드려 분쇄한다.
- ② 분쇄한 조직은 pancreas ribonuclease를 함유하는 추출 buffer 4 ml에 현탁하여, 15 ml polypropylene tube에 옮겨 37℃에서 1시간 반응한다.

(5) DNA 정제

- ① (3)과 (4)의 ①에서 얻은 추출액에 최종농도가 100 μ g/ml가 되도록 20 mg/ml proteinase K를 1/20 용량 첨가한 후, 튜브의 뚜껑을 닫고 부드럽게 충분히 교반하여 50℃에서 3시간 반응한다.
- ② 0.5 M Tris-HCl(pH8.0)로 포화한 phenol을 동량 첨가하여 잘 섞어 준다. 점성이 높아 충분히 혼합할 수 없는 경우는 50 mM Tris-HCl(pH8.0) -10 mM EDTA액으로 몇배 희석한 후, 50 ml의 polypropylene tube에 옮기고 동량의 phenol액을 첨가하여 혼합한다. Tip의 끝을 잘라내서 넓게 하여 점성이 높은 상층의 액을 새로운 튜브에 옮긴다. 실온에서 5000×g, 15분간 원심분리하여 두 층을 분리한다. 이 phenol 추출 과정을 3 회 반복한다.
- ③ DNA 용액을 15 ml 또는 50 ml polypropylene tube에 옮긴후, 10 M ammonium acetate를 0.2 vol. 첨가하여 혼합한다. 이 용액에 2 vol.의 ethanol을 첨가하여 섞일 때까지 부드럽게 상하로 회전한다. 이 때 DNA가 섬유상으로 침전이 일어나게 되는데, 이 침전 DNA를 tip의

끝으로 다른 튜브에 옮긴 후, 70% ethanol로 세척하고 튜브를 기울여서 ethanol액을 제거한다. 이 세척 조작을 2회 반복한다. 이 방법으로 얻은 DNA의 크기는 100~150 kb에 이른다.

- ④ 200 kb 이상의 고분자 DNA를 얻고자 할 때는 phenol로 추출하여 50 mM Tris-HCl(pH8.0)-10 mM EDTA(pH8.0) 액으로 투석한 후, ethanol 침전으로 DNA를 회수한다.
- ⑤ DNA가 저분자일 경우에는 섬유상으로 침전이 일어나지 않으므로 5,000×g에서 5분간 원심분리하여 침전물을 회수하고, 70% ethanol로 2회 세척한다.
- ⑥ 남아있는 ethanol을 제거한다. 건조시키는 경우에는 DNA의 침전이 완전히 건조하지 않도록 주의한다. 침전에 1 ml의 TE액을 첨가하여 튜브를 서서히 회전시키면서 DNA를 완전히 용해한다. 용해가 힘들 경우에 용해액을 새로운 튜브에 옮기고 투명한 점성의 침전에 새롭게 TE액을 첨가하여 용해한다.
- ⑦ 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 1 OD₂₆₀=50 μg/ml을 기준으로 농도를 계산한다. 10⁷개의 세포로부터 40 μg을, 100 mg의 조직으로부터 200 μg의 DNA를 얻을 수 있다.

2. Proteinase K/Phenol/Chloroform 추출법^{3,4)}

(1) 개요

기본적으로 1에서 소개한 방법과 동일하지만, PCR 주형으로서 사용하기에 충분한 크기면 된다는 관점에서 물리적인 절단도 일어날 수 있는 방법이다.

(2) 시약과 완충액

- ① 1× PBS(3.56 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.52 g NaH₂PO₄·2H₂O, 8.5 g NaCl/1 l).
- ② 2×용해 buffer(20 mM Tris-HCl(pH8.0), 20 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0.4% SDS).
- ③ 20 mg/ml Proteinase K 용액(이온교환수로 녹여서 조제하여 분주한 후, 동결보존하고 사용시 용해한다).
- ④ 0.5 M Tris-HCl(pH8.0)-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1).
- ⑤ TE 완충액(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA).

(3) DNA의 추출과 정제

- ① 10⁷개의 세포를 1 ml의 1×PBS로 현탁한 후, 동량의 2×용해 buffer를 첨가한다. 조직의 경우는 액체질소 내에서 분쇄한 후, 1×PBS로 현탁하여, 동량의 2×용해 buffer를 첨가한다.
- ② 점성이 높고 균일한 용해액이 될 때까지 vortex로 현탁한다.
- ③ 최종농도가 100 μg/ml이 되도록 20 mg/ml 농도의 proteinase K를 1/20 vol. 첨가한 후, vortex로 잘 교반하여 50℃에서 3시간 반응한다.
- ④ 동량의 0.5 M Tris-HCl(pH8.0)-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 첨가하여 완전히 혼합될 때까지 tube를 상하로 흔들어 상반한다.
- ⑤ 실온에서 5,000×g, 15분간 원심분리하여 두 층을 분리한다.
- ⑥ Tip의 끝을 절단한 후, 점성이 높은 상층의 DNA 용액을 새로운 tube에 옮겨 동량의 chloroform으로 추출한다. 실온에서 5,000×g, 15분간 원심분리하여 DNA 용액을 새로운 튜브에 옮긴다.
- ⑦ 1/10 용량의 3 M sodium acetate를 첨가한 후, ethanol을 2배 첨가하고 잘 교반하여, -20℃에서 1시간 이상 냉각한다.
- ⑧ 5,000×g, 5분간의 원심분리로 DNA를 침전시켜 회수한 후, 70% ethanol로 2회 세척한다.
- ⑨ DNA를 TE buffer으로 용해한다. 혼재하는 RNA를 제거하고자 하는 경우는 1의 방법과 같이 ①에서 20 μg/ml의 pancreas ribonuclease를 첨가하여, 37℃에서 1시간 반응한 후, 다음 단계로 진행한다. 또는 ⑨에서 얻은 DNA 용액을 20 μg/ml의 pancreas ribonuclease로 37℃에서 1시간 반응한 후, chloroform/isoamyl alcohol로 추출한다.
- ⑩ 260 nm에서 흡광도를 측정하여 1 OD₂₆₀=50 μg/ml을 기준으로 농도를 계산한다.

3. 알칼리 용해법³⁾

(1) 개요

세포를 알칼리 조건에서 가열하여 용해시키는 방법으로 PCR 해석용 DNA를 얻을 수 있다. 추출 과정에서 DNA 손실이 일어나지 않으며, 단일 tube를 사용하기 때문에 다른 DNA의 혼입을 방지할 수 있다.

(2) 시약과 완충액

- ① 액체질소
- ② 50 mM NaOH
- ③ Mineral oil(Sigma # M-5904)
- ④ 1 M Tris-HCl(pH7.0)

(3) DNA 추출

- ① 조직, 세포 등의 시료를 1.5 ml eppendorf tube에 넣고, 동량의 이온 교환수를 첨가하여 freeze-thaw 조작을 2회 반복한다.
- ② 5×10^6 개의 세포당 100 μ l의 50 mM NaOH를 첨가한다.
- ③ 세포가 완전히 현탁될 때까지 vortex로 교반한다.
- ④ Spin-down하여 150 μ l의 Mineral oil을 중층한다.
- ⑤ Heating block을 사용하여 95℃에서 10분간 정치한다.
- ⑥ 1 M Tris-HCl(pH7.0)을 첨가한다. 100 μ l의 50 mM NaOH에 대하여 16 μ l을 첨가한다. Mineral oil 층의 아래로 부터 용해액을 취하여 주형 DNA로 사용한다.
- ⑦ -70℃에서 동결보존한다.

4. Boiling법⁴⁾

(1) 개요

세포와 조직을 물에 끓이는 것만으로도 PCR용 DNA 시료를 얻을 수 있다.

(2) DNA 추출

- ① 세포와 조직을 eppendorf tube에 넣고, 이온 교환수로 현탁한다. 조직의 경우는 액체질소 안에서 분쇄한 후, 이온교환수를 첨가한다. 100 mg의 세포에 대하여 1 ml의 이온 교환수를 첨가한다.
- ② Tube의 뚜껑에 작은 구멍을 낸 뒤, Heating block 등으로 15분간 끓여 이 추출액을 DNA 시료로서 사용한다.

▶ 맺음말

PCR 과정에서 발생하는 가장 큰 문제는 외부로부터 다른 DNA가 혼입하는 것이다. 따라서 외부 DNA의 혼입을 최대한 방지해 주는 것이 추출단계에서 중요하다. 목적에 따라서는 추출하는 DNA의 질 및 회수량을 고려하지 않아도 되는 경우도 있다. 그리고 또 다른 문제점은 조제한 DNA

시료안에 PCR을 저해하는 물질이 존재한다는 것이다. 예를 들면 멜라닌 색소를 생산하는 악성 흑색 종양에서 추출한 DNA에는 강력한 PCR 저해물질이 존재하는데, 현재로서는 이 물질을 제거할 적합한 방법이 없다. 염화세슘을 이용하는 밀도 기울기 초원심분리로서, 어느 정도 효과를 거둘 수는 있으나, 완전하게 제거할 수는 없다. 따라서 가장 단순한 해결법은 통상 첨가하는 DNA양을 반응액량의 1/100 정도로 사용하는 것이다. 밀도 기울기 초원심분리로 정제한 DNA를 소량, 주형으로서 사용하면 대부분의 경우, PCR 산물을 얻을 수 있다.

II. 임상 검체에서의 주형 DNA 조제

PCR법은 기초의학 뿐만 아니라, 임상의학에도 널리 이용하고 있다. 그 중에서도 감염증 분야에는 매우 신속하고, 정확하게 활용할 수 있다. 임상검체로서는 분변, 혈액, 객담, 뇨, 수액, 뇌수, 복수, 환부 추출 가검물, 모유 등이 있다. PCR법을 이 임상검체에 응용하려면 검사재료에 따라 특수한 처리가 필요하기도 하고 또는 이전보다 더욱 간편하고 안전하게 처리할 수 있다. 몇몇 교과서에 기재되어 있는 기본적인 방법과 함께 새로운 방법들을 소개하면서 각종 임상검체의 진단에 관해서 설명한다. 그 중에서도 내장물이 많은 핵산의 검출에 관한 설명도 덧붙인다. 본 고는 분변에서의 핵산 조제법을 중심으로 정리한 것이다

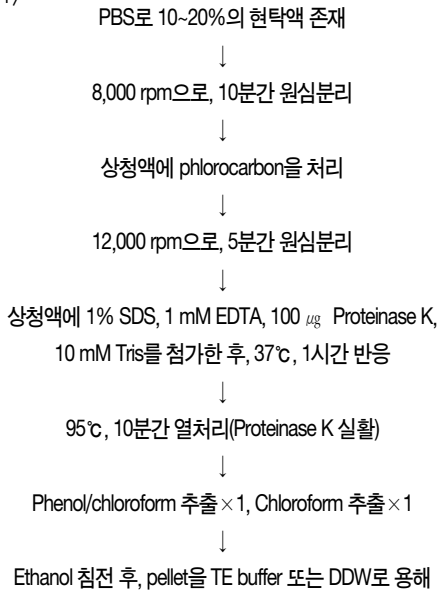
임상검체를 시료로 PCR법에 의한 감염증 진단을 실시할 때, 검체의 종류나 각 병원체에 따라 전처리법과 핵산추출법은 각각 다르다. 내장물이 많은 분변 검체와 객담 등의 점성이 높은 검체, 그리고 특히 혈액으로부터 림파구의 분획을 얻고자 하는 경우는 원심분리 이외의 특수한 전처리가 필요하다. 한편, 전처리 후의 핵산추출법도 종래의 phenol/chloroform법, guanidine thiocyanate를 사용하는 방법, 그리고 단순히 가열처리하는 방법 등이 있다. 따라서 실험을 시작할 때에는 연구자 스스로 여러가지 방법으로 시도해 볼 필요가 있다.

1. 각종 검체의 전처리

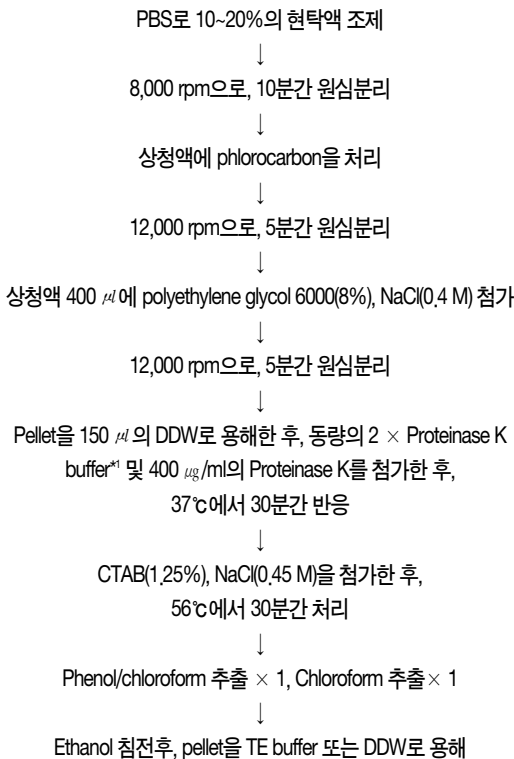
(1) 분변재료의 처리와 핵산 검출

분변 내에 존재하는 virus로는 viral diarrhoea와

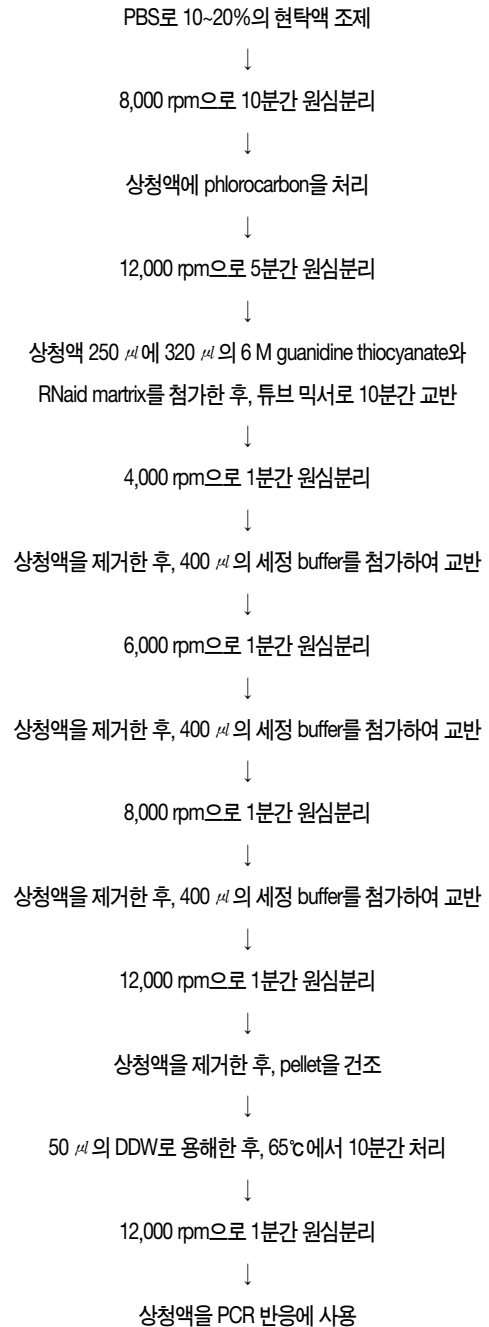
〈표 1〉



〈표 2〉



〈표 3〉



* 1 2×Proteinase K buffer: 2% SDS, 25 mM, 200 mM Tris, 0.3 M NaCl

enterovirus, 두 종류가 있다. 우선, viral diarrhoea로는 A군 rotavirus, 장 관 adenovirus, calcivirus,

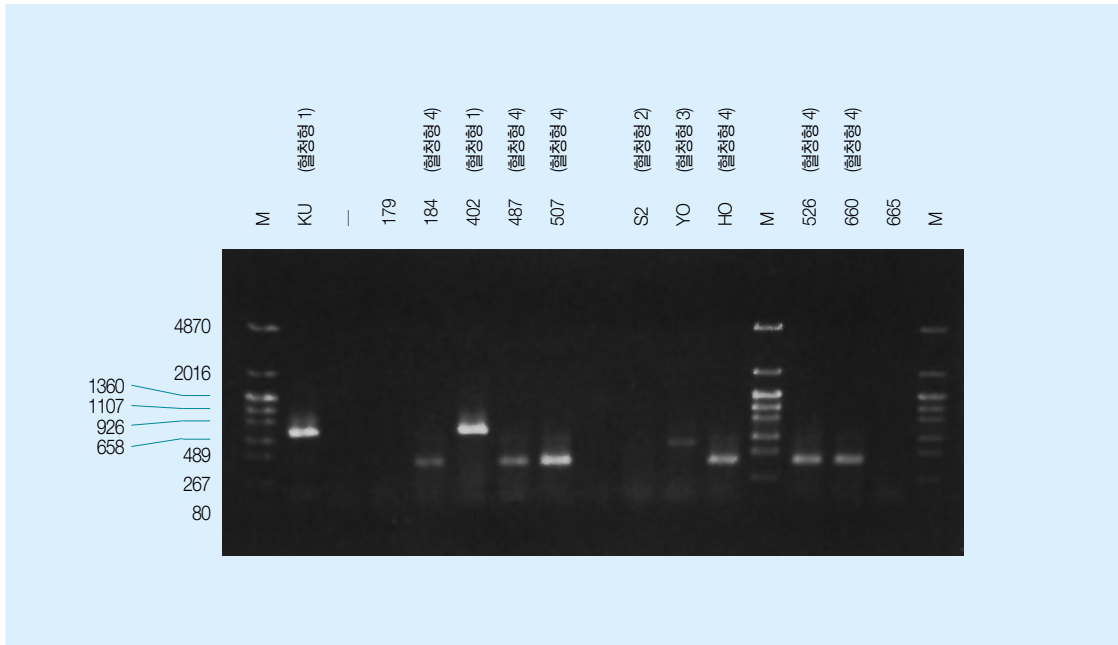


그림 1 PCR법에 의한 분변 검체로부터의 A군 rotavirus 검체와 혈청형별

왼쪽부터 M(분자량 marker), KU(혈청형 1, 표준주, 크기 749), —(음성대조), 179~507(임상검체), S2(혈청형 2, 표준주, 크기 657), YO(혈청형 3, 표준주, 크기 582), HO(혈청형 4, 표준주, 크기 394), M(분자량 marker), 526~665(임상검체), M(분자량 marker), 8검체 중 6검체에서 검출되었고, 혈청형별로는 1형이 1검체, 4형이 5검체에서 나타났다.

norwalkvirus, astrovirus 등이 있는데 이러한 virus의 검출에는 모두 PCR법을 이용하고 있다. 또한 각종 enterovirus의 검출에도 마찬가지로 PCR법을 이용한다. 즉, 대상으로는 ssRNA virus, dsRNA virus, dsDNA virus 모두가 포함되며 이러한 바이러스의 검출에도 PCR법을 도입하고 있다. 그리고 이 중에서 특히 불안정한 ssRNA virus를 취급할 때는 세심한 주의가 필요하다. 이외에 분변은 많은 불순물을 함유하므로 여러 가지 특수한 전처리를 거쳐야 한다. 본 고에서는 필자들이 실제로 실시하는 A군 rotavirus, calcivirus를 대상으로 한 PCR을 예로 설명한다.

분변 시료는 우선, PBS(phosphate buffered saline)로 약 10~20%의 현탁액을 제작한 후, 8,000 rpm으로 10분간 원심분리한다. 상청액에 동량의 phlorocarbon을 처리한 후, 다시 한 번 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 그 상청액을 PCR시료로 사용한다. 최종적으로 얻어진 현탁액에서의 핵산추출 대상이 양이 많고 안정한 dsRNA 구조를 핵산으로 갖는 A군 rotavirus⁵⁾인지 아니면 양이 적어

불안정한 ssRNA를 핵산으로 갖는 calcivirus⁶⁾인지에 따라 추출방법이 달라진다. 또한 종래의 phenol/chloroform에 의한 추출방법과 guanidine thiocyanate(GTC)를 단백질 변성제로서 이용하는 신속 Kit(RNaid)법이 있는데(표 1, 2, 3), 어떠한 경우에도 1.5 ml 용량의 micro tube로 조작할 수 있다.

우선, A군 rotavirus를 대상으로 한 phenol/chloroform법에서는⁵⁾ phlorocarbon 처리한 400 μ l의 분변 현탁액에 최종농도가 각각 1% SDS, 0.1 mg proteinase K, 1mM EDTA, 10 mM Tris(pH8)가 되도록 시약을 첨가한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨다. 95°C에서 10분간 proteinase K를 실행하여 phenol/chloroform으로 한 번, 계속해서 chloroform으로 한 번 추출한다. 얻어진 상청액에 2배 용량의 cold ethanol과 sodium acetate를 첨가하여 ethanol 침전을 유도한다. Pellet를 건조하여 TE(Tris-EDTA) buffer나 DDW(deionized distilled water)로 용해한 후, PCR에 이용한다(표 1). 그 예를 그림 1에 나타내었다.

한편, calcivirus의 경우는 phlorocarbon 처리한 400 μ l의

분변 현탁액에 최종 농도가 8% polyethylene, 0.4 M NaCl이 되도록 각 시약을 첨가하여 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한다. Pellet은 proteinase K buffer¹¹⁾로 용해하여 37℃에서 30분간 반응한다. 최종농도가 1.25 % CTAB(cetyl-trimethyl ammonium bromide), 0.45 M NaCl이 되도록 각 시약을 첨가하여 56℃에서 30분간 반응한다. 그 이후는 위와 같이 phenol/chloroform 추출과 ethanol 침전을 실시한다(표 2). 이 방법은 virus양이 매우 적고, 핵산으로서 불안정한 ssRNA 구조를 갖는 norwalkvirus에 도입하여 소구형 (small round structured virus) virus의 PCR에 많이 이용하고 있다⁶⁾. GTC를 사용하여 바이러스 단백질을 변성시키고, 유리한 핵산을 glass powder 또는 silica gel에 흡착하여 세척액으로 단백질과 그 이외의 협잡물을 제거하는 kit가 시판되고 있다. 이 kit는 조작이 신속하고, phenol을 사용하지 않으므로 안전하고 폐액 오염의 문제도 없다. 또한 처음부터 단백질 변성제가 포함되어 있기 때문에 RNase를 비활성화시키므로 불안정한 ssRNA도 높은 효율로 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한, kit에 첨부한 DDW나 각종 buffer류는 DEPC(diethyl pyrocarbonate)로 처리되어 RNase free의 tube나 pipette tip을 사용함으로써 RNA virus의 PCR에서도 안정한 결과를 얻을 수 있다(표 3).

(2) 혈액검체의 처리와 핵산의 추출

대상이 되는 미생물이 혈청 내에 존재하는지 또는 림파구 내에 존재하는지에 따라 그 조제방법은 다르다. 우선 필자들이 Parvovirus B19의 ssDNA를 혈청으로부터 추출한 예를 소개하고, 다음으로 HHV-6나 cytomegalovirus와 같이 주로 림파구 내에 존재하기 때문에 buffy coat를 채취하고 나서 추출을 실시하는 과정을 설명한다.

Parvovirus B19나 B형 간염 바이러스는 혈청 속에서 자유로운 상태로 충분한 양이 존재하기 때문에 다른 혈액 속의 바이러스에 비해 조제가 간단하다. 100 μ l의 혈청 시료에 400 μ l의 buffer[최종농도 500 μ g/ml proteinase K, 0.5% SDS, 5 mM EDTA(pH8), 10 mM Tris-HCl(pH8)]을 첨가한 후, 50℃에서 하루 종일 반응한다. 그 후 phenol/chloroform 추출을 2회 실시하고 chloroform 추출을 1회 실시하여 ethanol로 침전한다. 보다 간단한 방법으로는 혈청시료를 70℃에서 4초간 처리한 후 바로 PCR 반응을 실시할 수 있다. 감도를 고려하면

phenol/chloroform법이 좋지만, nested PCR법과 southern blotting법을 병용하면 같은 수준의 감도를 얻을 수 있다. 이 방법은 핵산 추출시에 일어날 수 있는 각 검체 간의 cross contamination을 최소한으로 억제할 수 있다. 혈청의 가열에 의한 PCR용 시료의 조제에는 온도와 가열 시간의 관계가 중요하다⁷⁾.

HHV-6나 cytomegalovirus의 경우, Ficoll-paque법 등으로 림파구 분획을 얻은 후에 phenol/chloroform법이나 간단히 가열 처리하는 방법으로 핵산을 추출한다. 그러나 감도나 재현성을 고려한다면 일반적으로 전자를 선택하는 것이 좋다. 보다 구체적인 내용은 다른 문헌에 자세하게 언급되어 있다⁸⁾. 또한 용혈조작으로 적혈구만을 제거하는 방법도 있다. 일반적으로는 혈액에 10배량의 TE buffer를 첨가하여 용혈시키고, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한다. 이 조작을 두번 실시하여 pellet을 시료로 이용한다.

(3) 객담의 전처리와 핵산의 추출

여기에는 결핵균 등의 항산균이 주된 대상이 되는데, 객담은 점성이 매우 높기 때문에 충분한 전처리가 필요하다. 여러가지 방법이 있지만 DTT(dithiothreitol) 또는 1 N NaOH를 처리하여 객담을 용해, 점조도를 저하시킨 후 원심분리 한다.

1 N NaOH를 같은 양의 검체에 첨가하여 실온에서 10분간 혼합한 후, 그대로 또는 1 M NaH₂PO₄를 첨가하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한다. PBS로 2회 세척하여 얻어진 침전물에 40~100 μ l의 lysozyme 용액 [1~2 mg/ml lysozyme: 10 mM Tris(pH8), 10 mM EDTA, 0.5% SDS]을 첨가한 후, 37℃에서 30분~2시간 정도 반응하고 proteinase K를 200 μ g/ml의 농도로 첨가하여 37℃에서 하루종일 반응한다. 검체는 세포나 협잡물을 많이 포함하고 있으므로, 핵산의 추출은 가열법보다는, phenol/ chloroform법을 사용한다⁹⁾. 검체가 바이러스인 경우는 lysozyme을 첨가할 필요가 없다. 0.1% DTT를 같은 양의 검체에 첨가하여 액상화할 때까지 충분히 반응한 후, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 한다. 그 후의 조작에서는 NaOH를 처리하여도 무방하나, 회수한 pellet의 용해처리(SDS, EDTA, proteinase K, lysozyme의 농도 등)는 지금까지의 예와 같이 실험자나 대상 병원체에 따라 적절히 선택한다. 적혈구의 혼입이 많은 검체는 위와 같은 용혈조작을 실시한다.

(4) 뇨, 수액, 흉수, 복수에서의 핵산 추출

뇨나 수액에서의 핵산 추출은 그다지 번거롭지 않다. 원심분리로 세포성분을 pellet화하여 시료로 사용하거나, 10 ml를 초원심분리로 1 ml 까지 농축하거나, 또는 아무런 농축 조작을 하지 않고서도 직접 PCR 검체로 사용할 수 있다. 이러한 시료에서의 핵산추출은 지금까지 언급해 왔던 가열법이나 phenol/chloroform법 또는 각종 kit로 실시한다. 적혈구의 혼입이 많은 검체는 위에서 설명한 용혈 조작을 실시한다.

(5) 비인강, 자궁경관 가검물로부터의 핵산 추출

기본적으로는 PBS 등에 용해 후 원심분리를 하여, pellet를 TE buffer으로 재부유하여 그대로 PCR에 사용하거나, 가열법이나 phenol/chloroform법 또는 각종 kit로 핵산을 추출하여 시료로 사용한다. 점성이 높으면 객담과 같이 처리하여도 무방하다.

(6) 모유에서의 핵산 추출

모유는 우선 2,000 rpm, 30분 정도의 저속으로 원심분리하여 최상층의 지방층을 제거한다. 그 다음으로 중간층의 상청액과 각종 세포로 이루어진 pellet를 나눈다. Pellet는 PBS로 적어도 2회 이상 세척한 것을 검체로 사용하는데, 상청액 내의 바이러스나 핵산을 완전하게 제거할 수는 없다. 상청액 또는 pellet로부터 핵산을 추출하는 방법은 전술한 phenol/chloroform법이나 간단하게 가열 처리하는 방법 그리고 kit를 사용하는 방법 등이 있다.

▶ 맺음말

임상검체를 시료로 하여 PCR법으로 감염증을 진단할 때, 필요한 각종 처리법이나 핵산추출법에 관하여 필자들의 연구실에서 실제 실시하는 내용을 중심으로 설명하였다.

특수한 전처리가 필요한 것이 있거나, 핵산 추출법을 선택할 필요가 있으면 검체 및 미생물에 따라 각각 다른 방법으로 실시한다. 예를 들면, 분변속에 극히 미량으로 존재하며 불안정한 ssRNA를 갖는 norwalk virus의 경우는 특수한 전처리를 실시함으로써 감도를 올릴 수 있다. 한편, 혈청 내에 다량으로 존재하고 보다 안정한 DNA를 핵산으로서 가지는 Parvovirus B19의 경우는 혈청을 간단하게 가열 처리하는 것만으로 PCR 반응을 실시할 수 있어 cross contamination을 최소한으로 억제할 수 있다. 그러나, 같은 혈청에서의 바이러스 검출이라도 HHV-6의 경우는 우

선 림프구 분획을 얻을 필요가 있고, 또한 핵산 추출법은 감도나 재현성을 생각하면 가열법보다는 phenol법을 사용하는 편이 더 낫다. 이처럼, 검체의 종류에 따라 전처리법이나 핵산추출법을 다양하게 선택해야 하므로 실험을 시작할 때는 연구자 스스로 여러 가지 방법으로 시도해 볼 필요가 있다.

III. 세포 진단 검체로부터의 조제

최근 분자유전학적 방법을 이용한 암세포에서의 염색체 및 유전자 이상의 검출과 암의 객관적 진단 및 악성도 판정이 시도되고 있다. 유전정보를 근거로 하는 암진단을 병리 세포 진단 등과 병용하여, 일상적인 screening 검사로서 암 임상분야에 실용화하는 데는 미량의 검체로부터 높은 효율로 보존시료를 제작하고 또한 고분자 DNA를 추출하는 기본조작을 필요로 하게 된다. 여기서는 필자들이 도입하고 있는 유선종양의 암세포진단을 중심으로, 침천자 흡인에 의한 종양세포의 채취로부터 DNA의 추출에 이르기까지의 과정을 설명한다.

세포진단은 환자에게 주는 고통도 적고, 간편하기 때문에 현재, 일상적인 암 임상 진단분야에서 빠뜨릴 수 없는 주요한 진단법으로 자리잡고 있다. 그 응용범위는 전신에 대한 모든 장기에 이르고 screening 검사에도 널리 활용되고 있다. 그러나 제한된 개개의 세포 형태를 근거로 병변을 진단해야 하므로 병리에 대한 학식과 경험에 의존하는 경향이 크다. 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 암세포에 생긴 염색체 및 유전자 변이를 검출하고, 그것을 지표로 수술 전에 암에 대한 객관적인 진단과 그 악성도의 판정을 시도하고 있다. 본 고에서는 필자들이 실시하고 있는 유선종양의 침천자 흡인 세포 진단을 중심으로 세포 진단검체로부터의 DNA 추출에 관하여 설명한다.

1. 세포 진단 검체 재료¹⁰⁾

대상장기에 따라 그 채취법이 다르다(표 1). 채취 검체의 성상에 따라 크게 액상과 그렇지 않은 것 두가지로 나눌 수 있다. 액상의 것은 주로 뇌수·복수 등의 체강액을 말하며 뇨·뇌척수액 등도 이 범주에 포함된다. 액상이 아닌 것에는 자궁경부 점막과 체부내막, 이 외에 기관지 점막에 대한 찰과 세포진단이나 유선, 전립선과 갑상선 등에 대한 천자흡인 세포진단 등이 있다.

| | |
|------|--------------------------------|
| 호흡기 | : 객담 세포진단, 기관지 찰과법, 기관지 세척법 |
| 여성성기 | : 자궁 경부 찰과법, 자궁 내막 흡인, 세척, 찰과법 |
| 소화기 | : 식도 · 위 세척, 찰과법 |
| 간담체장 | : 담즙 · 혈액 세포진단, 천자 흡인법 |
| 비뇨기 | : 뇨중 세포 진단 |
| 체강액 | : 뇌 복수 세포진단, 수액 세포진단 |
| 유선 | : 천자 흡인 세포진단, 유두 분비물 세포진단 |
| 갑상선 | : 천자 흡인 세포진단 |
| 전립선 | : 천자 흡인 세포진단, 전립선액 세포진단 |
| 기타 | : 림파절, 연부종양 등에 대한 것 |

표 1 암세포 진단

검체의 채취방법도 다양하므로 각각의 방법에 따라 주의해야 할 점들이 있다. 예를 들면 체강액 채취의 경우, 암세포의 대다수가 반듯하게 누운 상태의 환자에서는 등쪽으로 침전하고 있기 때문에, 천자하기 전에 환자의 체위를 전환한 후 채취하는 것이 좋다. 또한 뇨 채취 때에는 자연뇨보다 방광 세척법을 이용하는 것이 보다 확실하게 다량으로 박리 세포를 채취할 수 있다. 천자 흡인 세포진단에서는 시행자와 방법에 따라, 그리고 회수하는 검체량에 따라 차이가 생긴다. 흡인 피스톨식 천자기를 사용하는 유선종양의 천자흡인에서는 1회의 세포진단에 약 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ (평균 2×10^4)개의 세포를 얻을 수 있어 PCR 시료로서 충분한 DNA량을 추출할 수 있다.

이렇게 채취한 세포 중에 종양세포가 차지하는 비율을 그 형태와 핵의 크기 등을 기준으로 판정하는 것은, 추출한 DNA로부터 획득한 결과를 평가하는 과정에서 매우 중요하다. MASA(mutant allele specific amplification)법과 같이 변이형 DNA만을 특이적으로 증폭하는 방법을 이용하면 다량의 정상세포가 혼입되어 있을지라도 해석이 가능한 것으로 보고되어 있으나¹¹⁾, PCR-SSCP법으로 변이를 검출하는 경우 시료 세포 내에 종양세포가 10~20% 이상 포함되어 있어야 한다. 또한 microsatellite marker를 이용한 LOH(loss of heterozygosity)해석의 경우는 통상 시료의 50~60% 이상이 종양세포로 구성되어 있지 않으면 LOH의 판정은 곤란하다. 따라서, 이 과정을 소홀히 하면 추출한 DNA로부터 음성(정상)의 결과를 얻어도, 이 결과가 목적으로 하는 종양 조직을 반영한 결과인지, 비종양조

직의 혼입에 의한 "negative false (위음성)"인지를 판정하기가 어렵게 된다.

2. 검체 세포의 취급

액상 검체(흉복수, 뇨 등)는 기본적으로 대부분 부유세포이기 때문에 그 실험방법은 원칙적으로 배양세포를 다룰 때와 유사하다. 즉, 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 모은다. 흉복수 등의 체강액의 경우는 특히 피브린이 석출되기도 하므로 채취 직후에 헤파린 등의 항응고제를 넣어 두면 좋다. 또한 적혈구의 혼입이 많을 경우에는 1% saponin액으로 용혈시켜 두면 다음의 처리가 편리하다. 찰과 세포진단이나 천자 흡인 세포진단의 경우는 수용액으로부터 세포검체를 채취하여 부유세포로 만들거나, 통상의 방법과 마찬가지로 slide glass에 도말 또는 직접 압출하는 두가지의 방법이 있다. 천자의 경우에는 부유세포를 원심분리를 통해 가라앉힌 뒤, 소량의 PBS 또는 고정액으로 채부유한다. 얻은 세포의 일부는 검경하고 나머지 세포에서

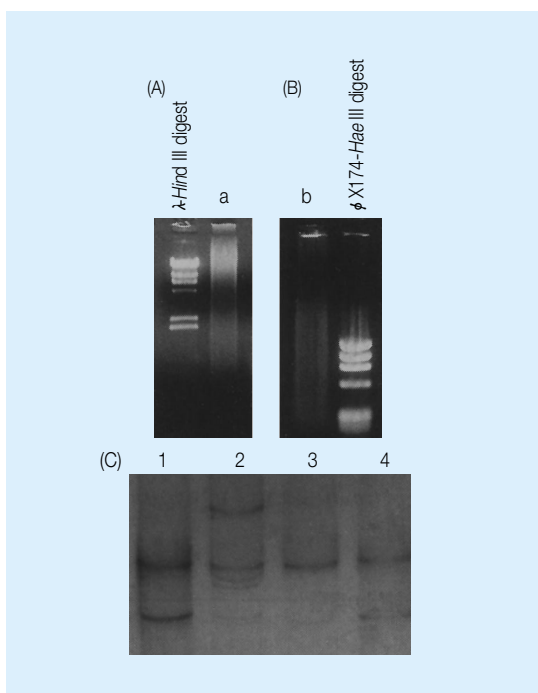


그림 1 세포진단 검체로부터의 DNA 추출 결과

(A), (B): 추출한 DNA를 0.8% agarose gel로 전기영동 한 것이다. Lane a는 한 번 부유세포로서 수확한 검체로부터의 DNA, lane b는 slide glass 표면에서 세포를 메스로 도말하여 추출한 DNA, (C): p53 유전자의 exon 5를 PCR-SSCP 법으로 조사하였다(silver staining). Lane 2에 이상 band를 확인한다.

DNA를 추출한다. 필자들은 FISH(fluorescence *in situ* hybridization)법을 유선종양의 천자 흡인 세포진단에 응용하여, 양악성진단과 암의 악성도를 판정하므로서 동일검체에서 FISH용 표본제작과 DNA 추출을 동시에 실시하고 있다. 한편, 천자 흡인 세포진단으로 얻은 중앙세포는 microtube 내에서 저장 처리한 후, 2배량의 carnoy's solution(methanol:acetate=3:1)을 증충하여 전고정한다. 저장 처리한 세포를 3,000~4,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 소량의 carnoy's solution으로 다시 한 번 현탁한다. 이중의 일부를 사용하여 FISH를 위한 표본을 제작하고, 한편으로는 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 개의 핵을 사용하여 DNA를 추출한다^{*1}. carnoy's solution으로 고정함에 따라 acetate에 의한 DNA 손상이 염려되나, 추출 시에 PBS로 세척하여 양질의 DNA를 확보할 수 있다(그림 1A).

세포를 직접 slide glass에 도말하는 방법에서는 현미경 검사로 확인한 세포로부터 DNA를 추출할 수 있다. 그러나 slide glass에 도말된 세포를 메스로 모으는 작업이 필요하다. 이 경우에도, DNA의 물리적 조작에 의한 단편화는 피할 수 없으나(그림 1B), PCR 시료로 사용하기에는 충분한 상태로 확보할 수 있다¹²⁾.

3. DNA 추출의 실제¹³⁾

DNA 추출 방법 자체는 미량의 세포를 취급한다는 것 이외에는 통상의 방법과 비슷하다. 아래에 필자들이 실시하고 있는 방법을 구체적으로 소개한다.

- ① 0.5 ml의 microtube에 세포의 부유액을 옮기고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액을 제거하여 100 μ l의 HMW^{*2}-proteinase K(100 μ g/ml)용액을 첨가한다.
- ② 가끔 교반하면서 37℃에서 4시간 이상 반응한다.
- ③ 같은 양의 HMW-saturated phenol을 첨가한 후, 회전판을 사용하여 실온에서 천천히 하룻밤 교반한다.
- ④ 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 직경이 큰 tip으로 상층을 회수하고 여기에 동량의 포화 phenol을 첨가한 후, 실온에서 약 2시간 교반한다.
- ⑤ 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상청액을 회수하고 여기에 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24:1)을 첨가한 후, 4시간 동안 실온에서 교반한다.
- ⑥ 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상청액을 회수하여, 0.1 vol.의 8 M ammonium acetate 용액, 2배량의 100% ethanol 그리고, 0.5 μ l의 2 % glycogen

- 을 동시에 첨가한 후, -20℃에서 약 1시간 ethanol 침전한다.
- ⑦ 4℃에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 glycogen과 추출 DNA의 침전물을 확인할 수 있다^{*3}.
 - ⑧ DNA를 포함하는 침전물을 70% ethanol로 세정하여 가볍게 건조한 후, TE buffer(20~100 μ l)로 녹인다. 그림 1의 (A), (B)는 위와 같은 방법으로 추출한 DNA를 0.8% agarose gel에 전기영동한 것이다. carnoy's solution에 부유한 세포 진단 검체에서도 다소 단편화가 일어난 고분자 DNA를 추출할 수 있었다. 그림 1의 (C)는 실제로 유방암의 천자 흡인 세포진단에서 추출한 DNA 시료로부터 PCR-SSCP법을 이용하여 p53의 변이를 검출한 예를 나타낸 것이다.

*1 필자들의 경험으로는 1×10^4 개의 세포에서 10~200 ng DNA를 얻을 수 있었다.

*2 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA-NaOH(pH8.0), 0.1% SDS.

*3 DNA만으로 ethanol 침전을 실시하여도 미량이기 때문에 육안으로는 확인할 수가 없다.

▶ 맺음말

세포 진단 검체의 채취에서 DNA 추출에 이르기까지 당 연구실에서 실시하고 있는 구체적인 방법을 소개하였다. 세포진단은 그 비침용성과 간편성 때문에 예방의학 분야에서도 집단검진을 위한 검사사항의 하나로서 활용되고 있다. 특히 미량의 세포 검체를 시료로 하는 분자 수준의 진단기술의 도입은 실용화단계에 이르고 있다.

IV. 채장에서 DNA 추출법

채장액 및 십이지장액을 검체로 유전자 해석을 실시할 때 사용하는 DNA 추출법에 대해서, 필자들의 연구실에서 실시하는 방법을 중심으로 소개한다. 채장액을 동결건조하여 얻은 분말 또는 채취 후 원심분리하여 얻은 pellet로부터 proteinase K/phenol/chloroform법에 의하여 DNA를 추출하고 있다. 채액 속의 DNA는 미량이기 때문에 ethanol 침전 때에 glycogen을 첨가하면 DNA 회수율을 올릴 수 있다.

임상검체를 사용한 유전자 해석을 위해서는 조직, 혈액, 체액, 파라핀 절편 등의 다양한 검체로부터 DNA를 추출해야 한다. 채장암의 유전자 진단을 위해서는 내시경 혹은 십이지장 tube를 사용하여 채취한 채장액 및 십이지장액으로부터 DNA를 추출한 후 PCR-SSCP법으로 채장암에서 높

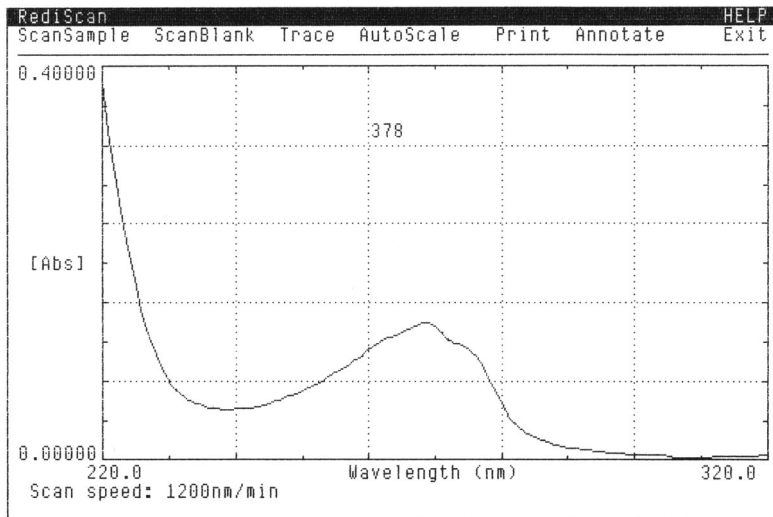


그림 1 채장액에서 추출한 DNA의 UV spectacle 흡수의 극대는 270 nm 부근에서 확인된다.

은 빈도수로 나타나는 K-ras codon 12의 point mutation을 검출한다^{1, 2)}. 본 고에서는 당 연구실에서 실시하는 채장액 및 십이지장액에서의 DNA 추출법을 소개한다.

1. 시약

- ① 생리식염수^{*1}
- ② Proteinase K 용액: Proteinase K(Merck사)를 다음의 용액을 사용하여 1 mg/ml의 농도로 조제한다(10 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.4% SDS)^{*1}.
- ③ SS-phenol
 - i) Phenol(Wako, chromatography-용)을 가온 용해(60℃ 전 후)하고, 산화방지를 위하여 8-hydroxyquinoline을 0.1% 되도록 첨가한다.
 - ii) 동량의 1 M Tris-HCl(pH8.0)^{*1}을 첨가하여 혼합한 후, 방치한다.
 - iii) 두 층으로 나누어지면 상층인 물층을 제거한다.
 - iv) ii), iii)을 2~3번 반복 실시한다.
 - v) 동량의 0.1 M Tris-HCl(pH8.0)^{*1}을 첨가하여 혼합하고, 방치한다.
 - vi) 물층을 제거한다(공기에 직접 접촉하지 않도록 약간의

물층을 남겨 둔다).

- vii) 2-mercaptoethanol을 0.2%가 되도록 첨가하여 혼합한 후, 4℃에서 차광하여 보존한다.
- ④ Chloroform
- ⑤ 3 M sodium acetate(pH7.4)^{*1}
- ⑥ Glycogen(molecular biology grade: Boheringer mannheim사)
- ⑦ Cold ethanol(-20℃에서 보존)
- ⑧ 80% Cold ethanol
- ⑨ TE buffer(10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA)^{*1}

^{*1} 시약조제 후, autoclave하여 멸균.

2. 채장액의 전처리

(1) 동결건조법

- ① 채장액 채취 후, 즉시 -80℃에 동결보존한다.
- ② 동결건조한 후, 채장액을 분말화한다.

(2) 원심침전법

- ① 채장액을 원심관에 넣은 후, 2,500 rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리한다.

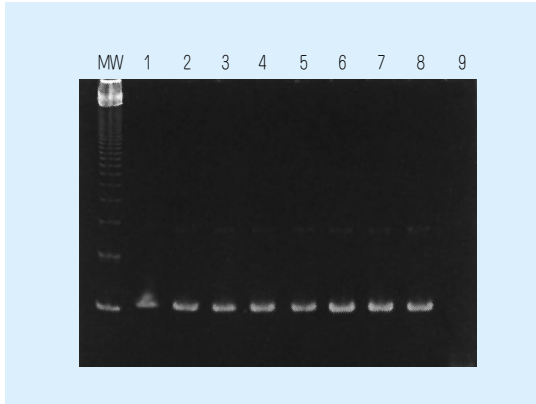


그림 2 본 방법으로 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 실시하고, K-ras 암유전자의 exon 1을 증폭한 것.

MW는 분자량 marker, lane 1~8은 웨장액 DNA, lane 9는 negative control을 나타낸다.

- ② 멸균한 스포이드를 사용하여 상청액을 다른 tube로 옮긴다.
- ③ Pellet에 약 2 ml의 멸균 생리식염수를 첨가, 혼합하여 2,500 rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리한다.
- ④ 상청액을 제거한다.
- ⑤ ③, ④를 반복한다.
- ⑥ Pellet를 -80℃에 보존한다.

3. DNA 추출법¹⁶⁾

- ① 전처리한 웨장액의 pellet에 1 ml의 proteinase K 용액을 첨가한 후(동결건조 분말의 중량/체적비로 10배량의 proteinase K용액을 첨가한다), 65℃에서 15분간 가열하여 37℃에서 하룻밤 진탕한다.
- ② 1:1 phenol:chloroform을 동량 첨가하여 mixed하고, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한다.
- ③ 수층을 새로운 tube로 옮겨 동량의 1:1 phenol:chloroform을 첨가, 혼합하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한다.
- ④ 수층을 약 400 μ l씩 2개의 eppendorf tube에 분주하고, 1/10 양 (40 μ l)의 3 M sodium acetate와 1 μ l의 glycogen 그리고 2.5배 양(1 ml)의 cold ethanol을 첨가하여 혼합한 후, -20℃에 약 1시간 이상 방치한다(여기서 하룻밤 방치하고, 다음 단계부터는 다음날 이후에 실시해도 좋다).
- ⑤ 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 침전을 확인하면서 상청액을 버린다.
- ⑥ 80% cold ethanol을 적당량(0.5~1 ml) 첨가하여 잘

혼합한 다음, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한다.

- ⑦ 상청액을 버리고, Speed Vac Concentrator (Savant사)를 사용하여 건조한다.
- ⑧ 한 검체당 TE buffer을 50 μ l씩 첨가하여 용해하고, 그 일부를 DNA 농도 측정용으로 사용한다.

▶맺음말

웨장액 및 십이지장액으로부터 DNA를 추출하는 방법에 대하여 설명하였다. 종래에 필자들은 웨장액을 채취한 후, -80℃에서 동결보존을 하였기 때문에 동결건조한 분말로부터 DNA 추출을 실시하였다. 현재는 웨장액 채취 후 즉시 원심분리와 세척을 반복하여 그 pellet에서 DNA를 추출하고 있다. Pellet는 장기간 보존이 가능하고, -20℃에서 안정하기 때문에 PCR이 가능하다. 웨장액 내에서는 세포 변성이 일어나기 쉬우므로 이 방법으로 추출한 DNA는 270 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내고 260 nm/280 nm의 비가 1.6 이하로 되는 경우가 많다(그림 1). 그러나, 통상적인 PCR을 시행하는 데 특별한 지장은 없다(그림 2). 통상 2 ml의 웨장액으로부터 DNA를 추출하고 있으나, 최종적으로 얻어지는 DNA의 회수량은 수백 ng정도이다. 이는 5~6회 정도 PCR을 실시할 수 있는 양이다(그림 2). Ethanol 침전 때에 glycogen을 carrier로서 첨가하면 DNA의 회수효율을 높일 수 있다.

💡참고문헌

- 1) Blin, N., Stafford, D. W. : *Nucl. Acids Res.*, **3**, 2303 (1976)
- 2) Maniatis, T., Fritsch, E., F., Sambrook, J. : in *Molecular cloning : a laboratory handbook*, pp. 9. 14-9, 19, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)
- 3) Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber Rolfs, I. : in *PCR : Clinical diagnostics and research*, pp. 79-89, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1992)
- 4) Jackson, D. P., Hayden, J. D., Quirke, P. : in *PCR : A practical approach* (ed. McPherson, M. J., Quirke, P., Taylor, G. R.), pp. 29-33, IRL Press, Oxford (1991)

- 5) Taniguchi. K., Wakasugi, F., Pongsuwanna, Y., Urasawa, T., Ukae, S., Chiba, S., Urasawa, S. : *Epidemiol. Infect.*, **109**, 303~312 (1992)
- 6) Jiang, X., Wang, J., Graham, D. Y., Estes, M. K. : *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2529~2534 (1992)
- 7) Frickhofen, N., Young, N. S. : *J. Virol. Methods*, **35**, 65~72 (1991)
- 8) Kondo, I. *et al* .단백질 핵산 효소, **35**, 3041~3047 (1990)
- 9) Narita, M., Matsuzono, Y., Shibata, M., Togashi, T. : *Acta Pediatr.*, **81**, 997~1001 (1992)
- 10) Yatani, K. *et al* . : 세포진단을 배우는 사람을 위하여, pp. 45-67, 의학서원 (1990)
- 11) Tskeda, S., Ichii, S., Nakamura, Y. : *Human Mutation*, **2**, 112-117(1993)
- 12) Wada, C., Shinoya, S., Fujino, Y., Rokuhiro, H., Akahoshi, T., Uchida, T., Ohtani, H. : *Blood*, **83**, 3449-3456 (1994)
- 13) 동경대학 의과학연구소 제암 연구부편 : 신 세포공학 실험 protocol, pp. 16-19, 슈우준사 (1983)
- 14) Kondo, H., Sugano. K., Fukayama. N., Kyogoku, A., Nose, H., Shimada, K., Ohkura, H., Ohtsu, A., Yoshida, S., Shimosato, Y. : *Cancer*, **73**, 1589-1594 (1994)
- 15) Fukayama, N., *et al* : 임상병리. **41**, 1017-1023(1993)
- 16) Davis, L. G., Dibner. M. D., Battey. J. F. : *Basic Methods in Molecular Biology*, pp. 44-46. Elsevier, New York (1986)

빠른 PCR, 믿을 수 있는 PCR!!

TaKaRa

TaKaRa Gradient Thermal Cyclers Dice

<Dice 특징점>

1. Compact & Stylish Body

Control Panel & Display 일체형으로 각도조절이 가능한 wing-panel 방식으로 설치장소에 구애받지 않습니다.

2. 간단조작

Pop-up Menu 방식 입력으로 그래픽적인 표시화면에서 간편하게 Programming 할 수 있습니다.

3. 다기능 & 고성능

Annealing 온도의 검토가 가능한 Gradient 기능, Touch Down PCR 등 다기능 고성능을 실현

4. 간단한 보수

PC와의 접속으로 software 의 update 와 data의 backup이 가능하며 PCR history 및 error history가 자동으로 보존됩니다.



PCR

증폭산물의 검출

I . Agarose gel 전기영동

II . Polyacrylamide gel 전기영동

III . Dot hybridization

I. Agarose Gel 전기영동

Agarose gel 전기영동은 PCR 증폭산물의 해석에 우선적으로 실시하는 방법이다. 조작이 매우 간단하여 목적으로 하는 증폭 DNA의 유무 및 비특이적 증폭 DNA의 유무를 해석하는 데에 사용한다. 최근에는 agarose의 품질이 현저히 향상되어, PCR 산물로서 일반적인 500 bp 이하의 DNA도 agarose gel 전기영동으로 해석할 수 있게 되었다. 또한 이외에 특수한 PCR 증폭산물의 해석에도 각각의 목적에 대응할 수 있는 agarose가 개발되고 있으므로 본 고에서 소개하고자 한다.

1. 일반적인 Agarose Gel 전기영동

(1) Agarose와 전기영동장치

종래의 유전공학 실험에서 사용되어 왔던 일반적인 agarose gel 전기영동에 관하여 설명한다. 일반적인 agarose gel 전기영동으로 0.5~20 kb의 DNA를 해석할 수 있다. 그리고 현재 사용하는 agarose가 전기영동용이라 하면 어떠한 것이라도 문제없이 사용할 수 있다. 그 한 예로서 Agarose L03 (TaKaRa Code 5003)을 들 수 있다. 전기영동장치로는 종래의 대형(약 15~20 cm gel용) submarine형이 있지만 증폭 DNA의 해석에는 mini gel 용 장치로 충분하다.

(2) Agarose Gel 전기영동의 실제¹⁾

A. 시약

50× TAE : 242 g Tris, 57.1 ml acetic acid, 100 ml 0.5 M EDTA(pH 8.0)를 1 l로 용해.

1× TAE : 50×TAE를 증류수로 50배 희석(최종농도: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), 1× TAE 대신에 0.5×TBE(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하는 경우도 있다.

6×1 oading buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol, 10 mg/ml ethidium bromide.

B. Gel 조제

① 1% agarose의 경우, 1 g의 agarose를 100 ml의 1×TAE에 첨가하여 전자렌지를 사용하여 용해한다. Gel 덩어리가 보이지 않을 때까지 가열하여 용해한 후 60℃정도가 될 때

까지 방치한다. Gel의 농도와 해석할 수 있는 DNA의 크기 사이의 상관관계를 표 1에 나타내었다. 이것을 참조하여 gel 농도를 결정한다.

- ② Gel tray에 comb을 set하고, 두께가 3~5 mm가 되도록 gel을 붓는다. Comb의 set 시, gel tray에서 1 mm 정도 간격이 있는가를 확인한다.
- ③ 30분 정도 실온에 방치하여 gel을 고정시킨다.

| Gel 농도(%[W/V]) | 분리범위(kb) |
|----------------|----------|
| 0.3 | 5~60 |
| 0.6 | 1~20 |
| 0.7 | 0.8~10 |
| 0.9 | 0.5~7 |
| 1.2 | 0.4~6 |
| 1.5 | 0.2~3 |
| 2.0 | 0.1~2 |

표 1 Agarose gel 농도와 분리범위 (참고문헌 1에서 인용)

C. 시료의 주입과 전기영동

- ① 시료에 6×loading buffer를 첨가한 후, well에 주입한다. 시료량은 10~100 ng, 10 μl 정도의 용량이 바람직하다.
- ② 전압은 5 V/cm gel 정도의 조건이 바람직하고, mini gel 일 경우, 100 V로 전기영동할 수 있다.

D. 염색 및 검출

- ① 염색에는 DNA 분자사이에 interchelation하여, 형광을 발하는 ethidium bromide를 사용한다. 0.5 μg/μl의 ethidium bromide액(1×TAE 또는 증류수에 용해)에 gel을 30분간 담군다.

Ethidium bromide는 gel 제작시, 0.5 μg/μl 농도로 미리 첨가할 수도 있다. 그러나 ethidium bromide는 전기영동 중에 (-)극 측으로 이동하여 gel에서 빠져 나갈 수 있으므로 ethidium bromide가 빠져 나가기 전에 전기영동을 종료해야 한다.

- ② 1×TAE 또는 증류수로 15분간 탈색하면 band가 선명해진다. 탈색이 반드시 필요한 것은 아니다.
- ③ Gel을 254 nm의 UV transilluminator 위에 얹은 상태로 사진촬영한다. 흔히 폴라로이드 MP-4 카메라에 3200B 필름을 사용하고 있다. 촬영시 적색 필터(예를 들어, 컴코-MC-R 1)를 사용한다.

E. 분자량 marker

전기영동할 때 분자량 marker를 시료와 함께 영동함으로써 증폭산물의 크기를 대략 계산한다. PCR 증폭산물의 해석에 자주 사용되는 분자량 marker로서는 pHY marker(TaKaRa Code 3404)가 있다. 또한 100 bp DNA Ladder(TaKaRa Code 3407), 200bp DNA Ladder(TaKaRa Code 3410), 500bp simple DNA Ladder(TaKaRa Code TK3411), 1kb Simple DNA Ladder(TaKaRa Code TK3422A), 1kb Plus DNA Ladder(TaKaRa Code TK3412), wide-range DNA Ladder(TaKaRa Code TK3416b)도 편리하다.

2. PCR 증폭산물의 해석에 유용한 Agarose

최근에는 분리능력이 우수한 agarose가 개발되어 종래의 polyacrylamide gel로서도 불가능했던 크기의 DNA를 agarose gel 전기영동으로 용이하게 해석할 수 있게 되었다. 그 대표적인 agarose의 종류 및 특징을 표 2에 정리하였다.

| Agarose % [W/V 1×TAE] | 분리범위(kb) | 비고 |
|--------------------------|--------------|--------------------------|
| NuSieve 3:1 | | |
| 3.0 | 500~1,000 | PCR 전반에 유효 |
| 4.0 | 100~500 | |
| 6.0 | 10~100 | |
| NuSieve GTG | | |
| 2.5 | 500~1,000 | 증폭 DNA의 회수에 |
| 3.5 | 100~450 | 유효한 저용점 agarose |
| 4.5 | 10~100 | |
| MetaPhor | | |
| 2.0 | 150~800 | Polyacrylamide gel과 |
| 3.0 | 100~600 | 동등한 분리능력을 가짐. |
| 4.0 | 50~250 | STR(short tandem repeat) |
| 5.0 | 20~130 | 해석에 유효. |
| SeaKem Gold | | |
| 0.3 | 5,000~50,000 | LA-PCR 증폭산물의 |
| 0.5 | 1,000~20,000 | 해석에 유효 |
| 1.0 | 400~8,000 | |

표 2 PCR 증폭산물에 유효한 Agarose

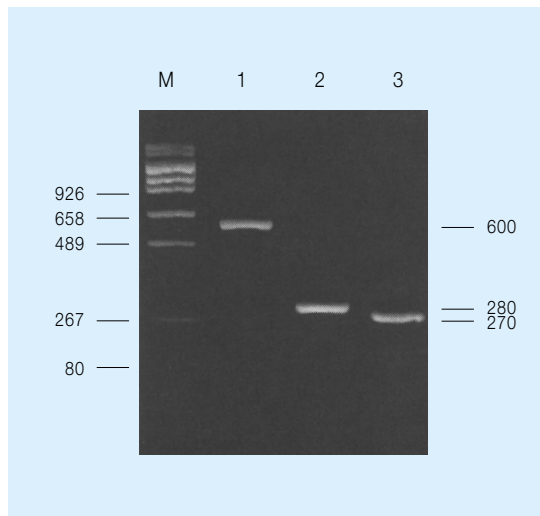


그림 1 Agarose Gel 전기영동에 의한 증폭산물의 해석

lane M: pHY marker, lane 1: 600 bp 증폭산물, lane 2: 280 bp 증폭산물
lane 3: 270 bp 증폭산물(4% NuSieve 3:1 Agarose를 사용)
lane 1~3은 plasmid 삽입단편인 600 bp, 280 bp 및 270 bp의 DNA를 증폭한 것.

(1) 500 bp 전후의 증폭산물 해석에 유용한 Agarose

가장 흔한 500 bp 크기 전후의 증폭산물을 해석할 때는 NuSieve 3:1 Agarose(Cambrex)를 많이 사용한다. 이 agarose는 10~1,000 bp의 범위에서 높은 분리능력을 가진다. 또한 Southern blotting도 통상적으로 실시할 수 있다. DNA fragment의 회수에는 이와 동일한 수준의 분리능력을 갖고 있는 저용점 agarose NuSieve GTG가 적합하다. NuSieve 3:1 Agarose를 사용하여 다양한 증폭산물을 해석한 예를 그림 1에 나타내었다.

(2) Microsatellite DNA의 해석에 유용한 Agarose

Microsatellite 염기 반복의 해석에는 4~8% polyacrylamide gel과 거의 동등하게 높은 분리능력을 갖는 MetaPhor Agarose(Cambrex 2~4% gel을 사용)가 유용하다. Agarose는 200~800 bp의 범위에서 2%의 길이 차도 검출할 수 있다.

(3) LA-PCR에 유용한 Agarose

LA-PCR에 의하여 증폭된 20 kb 이상의 DNA 해석에는 pulse field 전기영동용 SeaKem Gold Agarose(Cambrex)가 유효하다. 이 gel은 매우 높은 gel 강도를 가지고 있어

저농도에서도 취급이 용이하다. 0.4%의 gel로 20 kb 이상의 증폭산물을 해석할 수 있다.

▶ 맺음말

Agarose gel 전기영동은 분리능력이 우수한 agarose들의 개발로 인하여 PCR 증폭산물의 해석에 널리 이용되고 있다. 그러나 증폭산물에 비특이적 밴드가 존재할 경우 목적 증폭산물이라고 오인할 위험성을 가지고 있다. 목적 유전자의 존재여부를 PCR로 판정할 경우에는 적어도 목적 증폭산물의 positive control을 동시에 영동하여 증폭산물이 positive control과 반드시 같은 크기임을 확인할 필요가 있다. 또한 전기영동만으로 판정하는 것이 불충분할 수도 있으므로 hybridization을 통하여 증폭산물이 목적 유전자임을 확인하는 것이 바람직하다. 이를 위하여 전기영동한 후 southern hybridization 또는 dot hybridization을 실시한다.

II. Polyacrylamide Gel 전기영동

Polyacrylamide gel 전기영동은 저분자 DNA의 해석에 아주 유용하다. 그러나 gel을 제작하는 조작이 번거로워, 최근에는 분리능력이 우수하게 개발된 agarose를 많이 사용한다. 본 고에서는 일반적인 polyacrylamide gel 전기영동을 소개함과 아울러 DNA sequencing, SSCP 및 DGGE에서 사용되는 특수한 polyacrylamide gel에 대해서도 간단하게 언급한다.

1. 일반적인 Polyacrylamide Gel 전기영동

(1) Polyacrylamide Gel 전기영동의 이점

Polyacrylamide gel 전기영동을 이용하면 ① 분리능력이 매우 우수하여 0.2%의 길이차(500 bp 중 1 bp)도 분리할 수 있고, ② 10 μ g 정도의 대량의 DNA도 폭 1 cm의 well을 사용하면 분리능력의 손상없이 영동할 수 있으며, ③ gel에서 DNA를 회수할 경우 agarose에 비하여 높은 순도의 DNA를 얻을 수 있다는 장점을 활용할 수 있다.

(2) 전기영동장치

Polyacrylamide gel 전기영동에는 slab형 장치를 사용하며, mini gel용(9×8 cm 정도)으로도 충분하다.

(3) Polyacrylamide Gel 전기영동의 실제⁹⁾

A. 시약

30% acrylamide(29:1 acrylamide:bis-acrylamide); acrylamide 29 g, *N*, *N*'-methylene bis-acrylamide 1 g에 증류수를 첨가하여 100 ml이 되도록 용해.

| Gel 농도(%[W/M]) | 분리범위(bp) |
|----------------|-------------|
| 3.5 | 1,000-2,000 |
| 5 | 80-500 |
| 8 | 60-400 |
| 12 | 40-200 |
| 15 | 25-150 |
| 20 | 6-100 |

표 1 Polyacrylamide gel 농도와 분리범위(문헌 1에서 인용)

· 5× TBE

54 g Tris, 27.5 g Borate, 20 ml 0.5 M EDTA(pH 8.0), 1 l가 되도록 증류수로 용해.

· 1× TBE

5×TBE를 증류수로 5배 희석[최종농도: 89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA(pH 8.0)].

· 6× loading buffer

0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol.

B. Gel 조제

① Glass plate를 충분히 세척한 후 spacer(1 mm 두께)와 함께 set하여 클립 등으로 고정한다.

② 표 1을 참고로 gel 농도를 결정하고, 30% acrylamide와 5× TBE를 적당량 첨가하여 증류수로 희석한 후 gel 용액을 조제한다. TBE의 최종 농도는 1×로 한다. 그리고 100 ml의 gel 용액당 0.7 ml의 10% ammonium persulfate를 첨가한 후 최종적으로 TEMED(*N*, *N*, *N*', *N*'-tetra methyl ethylene diamine)를 100 ml당 35 μ l 씩 첨가한다.

③ Gel 용액을 glass plate에 주입한 후 comb을 set한다. 약 1시간 방치하여 gel을 굳힌다.

C. 시료의 주입과 전기영동

① Gel plate를 전기영동장치에 set한 후 상하의 영동조에 1× TBE를 넣고, comb을 빼낸 well은 pipette로 잘 세척한다. 시료를 영동하기 전에 30분 정도 prerunning을 해주는 편이 좋다.

② 시료에 6× loading buffer를 첨가하여 well에 주입한다.

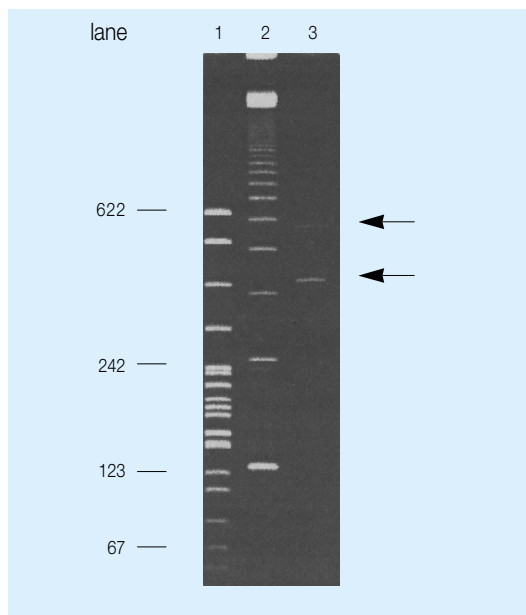


그림 1 Polyacrylamide gel 전기영동에 의한 DIS80의 해석

lane 1: pBR322/Msp I digest Marker, lane 2: 123 bp ladder Marker, lane 3: DIS80 증폭시료. 5.5% polyacrylamide gel에서 전기영동. lane 3의 증폭시료에서는 16염기의 단위로 그 반복 수가 다른 두개의 band를 확인할 수 있다.

③ 1~8 V/cm gel의 조건으로 전기영동한다.

D. 염색 및 검출

염색은 agarose gel 전기영동 때와 동일하게 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 ethidium bromide액으로 실시한다. 그림 1은 5.5% polyacrylamide gel에 의하여 VNTR의 DIS80을 해석한 예이다.

2. 특수한 목적으로 사용하는 Polyacrylamide Gel

여기서는 증폭산물을 특수한 방법으로 해석할 때에 사용하는 polyacrylamide gel에 관하여 소개한다.

(1) DNA Sequencing 및 AP-PCR³에 사용하는 Gel

6~8% acrylamide(19:1 acrylamide:bis-acrylamide), 1×TBE, 7 M urea, 20 cm×40 cm×0.3 mm 두께의 gel을 사용.

(2) PCR-SSCP⁴에 사용하는 Gel

5% acrylamide(49:1 acrylamide:bis-acrylamide), 0.5×TBE, 5% glycerol, 20 cm×40 cm×0.3 mm 두께의 gel을 사용. 4℃ 또는 25℃에서 전기영동.

(3) DGGE⁵에 사용하는 Gel

6.5~12% acrylamide(37.5:1 acrylamide:bis-acrylamide), 40~80% 변성제(80% 변성제: 5.6 M urea, 32% formamide), 1×TAE, 60℃에서 영동.

▶ 맺음말

Polyacrylamide gel 전기영동은 분리능력이 우수한 agarose가 개발되어 사용빈도가 낮지만 높은 분리능력을 가지므로 microsatellite와 같이 몇 개의 염기 차이를 판명해야 할 경우 그리고 AP-PCR이나 PCR-SSCP와 같이 보다 정밀한 분리를 필요로 하는 경우에는 필수적이다.

III. Dot hybridization

PCR에 의하여 증폭한 DNA가 목적으로 하는 유전자임을 확인하는 데는 단순히 전기영동에 의하여 크기를 해석하는 것 이외에, hybridization을 통하여 목적으로 하는 유전자 서열을 함유하는지 확인할 필요가 있다. Dot hybridization을 이용하면 간단한 조작으로 목적 유전자를 확인할 수 있다.

증폭산물의 해석에 있어서 전기영동만으로는 목적 유전자의 존재여부를 판정할 수 없으므로 hybridization에 의하여 증폭산물이 목적 유전자임을 확인할 필요가 있다. 목적의 증폭산물 내에서 probe를 설정하여 southern hybridization 또는 dot hybridization을 실시함으로써 증폭된 DNA가 확실히 목적 유전자인지를 확인한다. 또한 hybridization에 의하여 전기영동보다 높은 검출감도로 목적 유전자를 검출할 수 있다. 본 고에서는 일반적인 dot hybridization의 조작과 dot hybridization에 의한 1염기 변이의 검출 및 reverse dot blot법에 관해서도 간단히 언급한다.

1. 일반적인 Dot Hybridization

여기서는 oligonucleotide probe를 사용하여 dot hybridization을 실시하는 일반적인 방법을 소개한다.

(1) Oligonucleotide Probe

증폭 DNA 범위 내에 18~30 염기의 probe를 설정한다. Probe는 목적 유전자의 특이적인 영역에서 선택하여야 한다. 또 5' 말단을 ³²P 또는 biotin으로 표식한 것을 probe로 사용한다.

(2) Dot Hybridization의 실제

A. 증폭산물의 막에 고정

- ① 증폭산물을 96℃에서 10분간 열처리하여 얼음속에서 급냉하여 5분간 방치하거나 0.1~0.4 N NaOH로 변성시킨 후 100 mM Tris(pH 8.0) 또는 동일 농도의 acetate로 중화시킨다.
- ② Nylon membrane(Amersham사 Hybond-N⁺ 등)을 적당한 크기로 자른 후 spot할 위치를 표시한다. 유성볼펜을 사용하면 기록이 없어지지 않으므로 편리하다. Dot 간의 간격은 1 cm정도가 좋다.
- ③ 표시한 위치에 변성시킨 증폭산물 1~2 μ l를 spot한다. 20~50 μ l에 이르는 대량의 증폭산물을 spot하고자 할 경우에는 dot blotting을 사용한다. Dot blotting에는 slot-blot manifold(Schleicher & Schuell)나 Bio-Dot(Bio rad)등이 있다.
- ④ Nylon membrane을 254 nm의 UV transilluminator로 5분간 조사하여 DNA를 고정시킨다. DNA 손상을 방지하기 위하여 장시간 조사하지 않도록 한다.

B. Oligonucleotide probe의 표식

RI 표식의 probe를 사용하는 경우에는 20 pmol의 probe를 T4 polynucleotide kinase, [γ -³²P]ATP로 표식한다.

C. Hybridization

- ① Nylon membrane을 polyethylene bag에 넣고, 아래의 prehybridization buffer를 첨가하여 42℃에서 2시간 보온한다.
[Prehybridization buffer]
5×Denhardt's, 5×SSC, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA
- ② ①의 용액에 표식한 probe를 첨가하여 42℃에서 2시간 동안 보온한 후, hybridization을 한다. Hybridization 온도는 oligonucleotide probe의 T_m 값에 따라 다르지만, 낮은 온도에서 hybridization을 하더라도 세척 과정에 의해 비특이적 hybridization을 제거할 수 있다.

D. 세척

- ① 2×SSC, 0.1% SDS로 실온에서 10분간 2회 세척한다.
- ② 0.2×SSC, 0.1% SDS로 55℃에서 15분간 2회 세척한다. 이 세척 온도는 oligonucleotide probe의 T_m 값에 따라 다르므로 예비실험으로 비특이적 hybridization이 일

어나지 않는 온도를 설정할 필요가 있다.

E. Autoradiography

Nylon membrane을 건조한 후 X선 필름으로 autoradiography를 찍는다.

F. 비 RI 표식 probe를 사용한 경우의 발색 또는 발광조작

예를 들면, biotin-labeled probe를 사용하는 경우에는 hybridization 후 막을 peroxidase-labeled avidin 또는 alkaline phosphatase-labeled avidin과 반응시키고, 계속해서 적당한 발색기질 또는 발광기질을 첨가하여 발색 및 발광반응을 실시한다

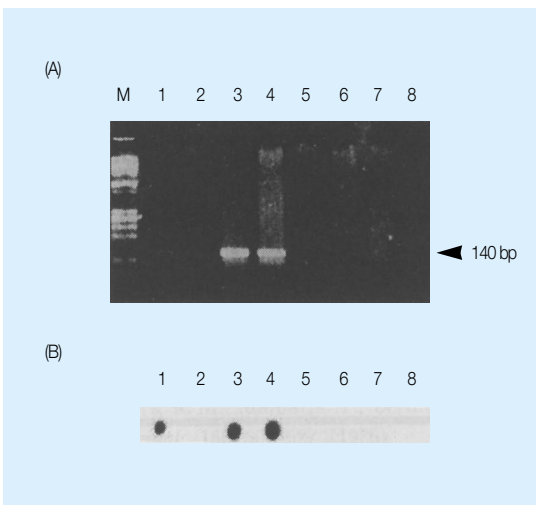


그림 1 Dot hybridization에 의한 HPV16의 검출

(A) HPV 16 특이적 primer로 증폭한 PCR 산물의 agarose 전기영동.

(B) ³²P 말단표식한 HPV16 특이적 oligonucleotide를 probe로 하는 dot hybridization에 의한 증폭산물의 검출. lane M: ϕ × 174 Hae III digest Marker, lane 1: SiHa 세포(HPV16 양성), lane 2: HeLa 세포(HPV18 양성), lane 3, 4: 자궁경부암조직(HPV16 양성), lane 5, 6: 자궁경부 condyloma 조직 (HPV6/11 양성), lane 7, 8: 정상자궁경부조직(HPV 음성). HPV 16 양성인 lane 1, 3, 4에서만 140 bp의 증폭 DNA가 확인되었고, dot hybridization에서도 dot가 확인되었다.

(3) Dot hybridization의 실험예

그림 1에 ³²P표식 probe를 사용하는 HPV16 DNA 증폭산물의 dot hybridization 결과를 나타내었다. HPV16을 함유한 1, 3, 4의 시료에서는 전기영동으로 증폭 DNA가 확인되었고 dot hybridization에서도 그 증폭이 확인되었으나 HPV16을 함유하지 않은 그 외의 시료에서는 확인되지 않았다.

2. 1염기의 변이를 검출하는 Dot Hybridization

Dot hybridization에 의하여 1염기 변이를 검출할 수 있다. Hybridization후의 세척조작 시에 tetrazolium 염화물을 이용하면 증폭산물과 probe가 완전히 일치하는 hybrid와 1염기의 mismatch도 구별할 수 있는 엄격한 hybridization을 실시할 수 있다. 이 기술은 *ras oncogene*⁶⁾과 유전병 관련유전자의 1염기 변이 및 HLA의 DNA typing 등에 사용되고 있다.

사용하는 oligonucleotide probe의 길이는 18~20 사이가 적당하며 변이 염기가 중심에 오도록 probe를 설정하는 편이 좋다. 이와 같은 probe를 ASO(allele specific oligonucleotide) 또는 SSO(sequence specific oligonucleotide)라 한다.

3. Reverse Dot Blot법

HLA typing과 같이 많은 SSO probe를 사용하여 dot hybridization을 실시할 경우는 그 조작이 번거롭다. Saiki 등은 필터에 수많은 SSO probe를 고정해 놓고 이것에 증폭산물을 hybridization시키는 reverse dot blot법을 개발하였다⁸⁾. 이 방법을 이용하면 검체수가 많은 경우에 그 조작이 간단하게 된다. SSO probe를 필터에 고정하기 위하여 우선 SSO probe에 terminal deoxyribonucleotidyl transferase를 사용하여 T염기를 부가한 후 UV 조사로 nylon membrane에 고정하고 biotin 등으로 표식한 증폭산물로 hybridization을 실시한다. Hybridization은 통상의 조건과 동일하게 실시한다.

▶맺음말

Dot hybridization은 southern hybridization처럼 증폭산물의 길이를 확인할 수 있는 것은 아니지만 간편한 조작으로 목적 유전자를 확인할 수 있다는 장점을 갖는다. 또한 시료수가 많을 때 특히 그 위력을 발휘한다. 그리고 tetramethyl ammonium chloride를 사용한 dot hybridization에서는 1염기 변이도 검출할 수 있어, 1염기 변이를 검출하는 방법으로서 아주 단순하고, 정확한 판정이 가능하다.



참고문헌

- 1) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. : *in* Molecular Cloning, 2nd edition, pp. 6. 3-6. 35, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989)
- 2) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. : *in* Molecular Cloning, 2nd edition, pp. 6. 36-6. 48, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989)
- 3) Welsh, J., McClelland, M. : *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213-7218 (1990)
- 4) Hayashi, K. : 단백질 핵산 효소, **35**, 3085-3090 (1990)
- 5) Myers, R. M., Maniatis, T., Lerman, L.S. : *Meth. Enzymol.*, **155**, 501-527 (1986)
- 6) Vries, M. V., Bogaard, M. E., Elst, H., boom, J. H., Eb, A. J., Bos, J. L. : *Gene*, **50**, 313-320 (1986)
- 7) Kimura H., *et al.* : 단백질 핵산 효소, **35**, 3091-3103 (1990)
- 8) Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., Erlich, H. A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6230-6234 (1989)

PCR 기초 실험법

1. 반응 온도와 cycle 수의 설정

본 고에서 표준적 heat block 방식의 DNA 증폭장치를 이용하여 통상의 PCR을 수행하는 경우를 중심으로 설명한다.

(1) 변성 온도와 시간

열변성 조건으로는 94℃, 30초~1분을 표준으로 하지만, 반응액의 양이 적어 반응액의 온도가 빠르게 고온으로 올라가는 경우에는 30초이하로도 충분한 경우가 있다. 극단적인 예이지만, microcapillary를 이용한 반응에서는 1초의 변성으로도 충분한 경우가 있다. 변성온도는 93℃로도 충분한 경우가 많으나, 94℃가 무난하다. 필자의 경험에서는 GC 함량이 높은 토끼 globin 유전자의 경우, 93℃에서는 증폭이 잘 되지 않았으나, 94℃ 변성으로 증폭한 적이 있었다. 목적서열에 따라서는 95℃까지 올려도 좋다. 토끼 globin의 예에서 경험한 바와 같은 1℃의 차이는 증폭장치의 반응오차로도 일어날 수 있는 범위이므로, 논문 등에서 찾은 조건을 자신의 실험실에서 재현할 때에는 주의해야 한다. 토끼 globin을 A기종에서는 93℃, 1분 변성으로 증폭할 수 있었던 반면, 다른 B기종에서는 증폭할 수 없었던 적도 있었다. 열변성에서 주의해야 할 점중의 하나는 변성 시간이 길어지면 효소가 실활한다는 점이다. 이러한 점을 고려하여, 처음 PCR 조건을 설정하는 경우에는 우선 열변성 조건을 94℃, 1분으로 해 보고, 증폭이 잘 되지 않으면 온도를 변경하는 것이 좋다. 또 genome DNA와 같이 긴 주형을 사용하는 경우에는 주형 DNA를 완전히 변성하기 위해 첫번째의 열변성을 5분 정도로 한 다음, 통상의 cycle

로 들어가도록 설정한다.

(2) Annealing 온도와 시간

Annealing 온도는 primer의 T_m 에 유의하여 설정한다. 통상 1분이 적당하다. 목적단편 이외의 비특이적 증폭이 일어나면, 2℃ 간격으로 온도를 올려 본다. 증폭되지 않는 경우에는 2℃ 간격으로 온도를 내려 본다.

(3) 신장반응 온도와 시간

신장반응은 통상 72℃에서 한다. 신장시간은 목적단편의 길이에 따라, 1 kb이하의 경우는 1분으로 충분하며, 이 보다 긴 경우에는 1 kb에 1분의 비율로 길게 설정한다. 통상의 *Taq* polymerase의 경우는 수 kb까지만 증폭할 수 있으므로, 신장시간은 길어봐야 3~5분으로 설정하지만, long PCR의 경우에는 10분이상으로 할 수도 있다. 통상의 PCR에서는 우선 1분으로 하여 실시한다.

(4) Cycle 수

효소는 장시간의 가열로 그 활성이 실활 되므로, cycle 수를 필요이상 늘릴 경우, 효소가 실활된 이후의 cycle은 전혀 무의미하다. 또 효소가 실활되기 전 단계일지라도 PCR 산물이 plateau(평형상태)에 도달한 후의 cycle도 의미가 없다. 이러한 점을 고려하면 cycle 수는 통상 30회 정도로 설정하는 것이 좋다. 30 cycle로 충분한 증폭이 일어나지 않는 경우는 35 cycle 정도까지 횟수를 늘려 본다.

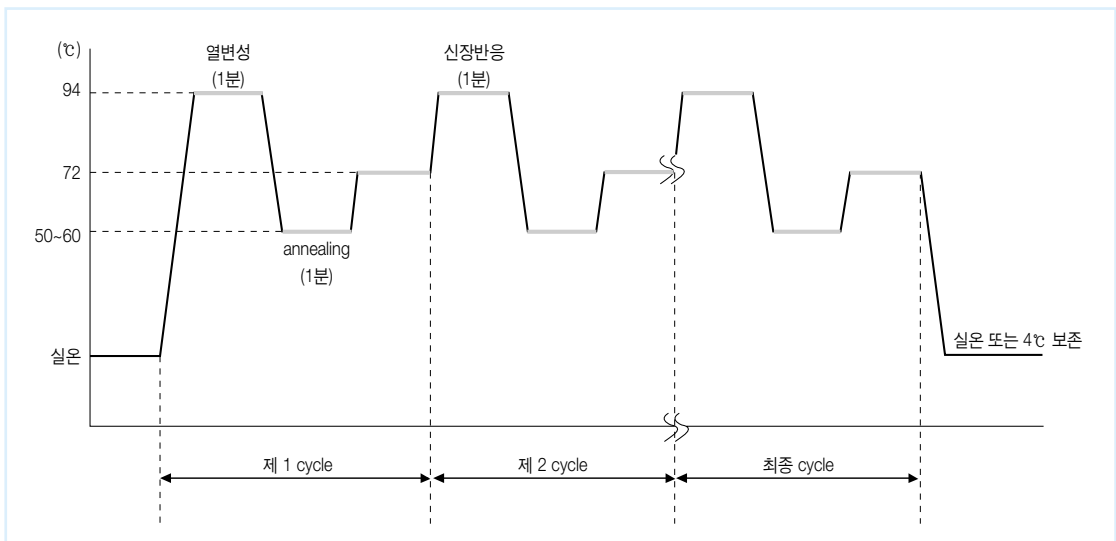


그림 1

(5) 대표적 Cycle의 예

이상의 주의점들을 고려한 표준 PCR의 온도와 시간조건을 그림 1에 나타내었다. DNA 증폭장치에 따라서는 열변성, annealing, 신장반응의 각 단계를 이행할 때에 온도기울기로 이행하는 것도 있으나, 통상은 각 단계간의 이행은 최단시간(기종에 따라 0초 또는 1초로 표시한다)으로 설정해 두는 것이 좋다. 또 많은 기종에서는 복수의 cycle program을 연결하여 복잡한 반응을 실시할 수 있다. 이 경우에는 최종반응 후에 신장반응을 추가하여, 마지막에는 4℃로 보존하도록 짜여져 있다. 그러나 필자의 경험으로 미루어 볼 때, 최종반응 후의 과정은 반드시 필요한 것은 아니며, 통상의 cycle로 반응을 한 후 실온에 방치해 두어도 문제가 되지는 않는다.

2. 반응액의 조제

(1) Primer의 농도

Primer의 최종농도는 통상 0.5 μ M로 한다. 혼합 primer처럼 각 primer 분자의 농도가 낮은 경우에는 농도를 조금 높여도 좋으나, 대부분의 경우 0.5 μ M 보다 농도가 높으면 비특이적인 증폭이 일어날 확률이 높으므로 피하는 것이 좋다^{*1}. 우선 0.5 μ M로 검토하고, 그래도 비특이적 증폭이 보이면 0.2 μ M 까지 농도를 낮추어 보는 것도 좋은 방법이다.

*1 필자의 예에서는 mouse genome DNA를 주형으로 한 PCR을 할 때에 primer 농도가 1 μ M일때는 목적 밴드가 전혀 증폭되지 않고, 농도를 0.5 μ M로 낮추었을 때 증폭된 적이 있다.

(2) dNTP의 농도

시판하는 Taq polymerase는 0.2 mM의 dNTP농도에서 최대활성을 가지도록 buffer 및 기타 성분을 조정해 놓은 것이다. 기질농도는 높다고 해서 좋은 것은 아니다. dNTP 농도를 2배로 하었을 때 오히려 증폭이 전혀 일어나지 않은 경우도 있었다.

(3) 효소의 농도

효소의 농도는 반응액 100 μ l 당 2.5 U를 표준으로 한다. 조건검토를 통해 2.5 U보다 적은 양으로도 반응이 가능하다면 적게 넣어도 된다. PCR용 내열성 DNA polymerase의 농도는 대체로 5 U/ μ l이므로, 2.5 U의 효소량은 micropipette의 crystal tip으로 정확히 계산할 수 있는 한계에서 0.5 μ l에 해당한다. 효소액은 동결방지를 위해

glycerol을 함유하고 있으므로 점성이 높아 0.5 μ l이하의 용량을 정확히 취하는 것은 불가능하다. 따라서 1검체만 하는 경우에도 반응액은 100 μ l로 조제하는 것이 무난하다. 효소농도가 높으면 비특이적 증폭을 일으킬 수 있다. 검체가 많은 경우는 master mix를 조제하여 분주한 후에 시료를 첨가함으로써 1검체당 최종 반응액을 줄일 수 있다. 또 분주조작시 tube를 1개 더 준비하여 시료 대신 증류수를 첨가함으로써 negative control을 설정할 수 있다.

(4) 주형량

주형 DNA의 양도 많다고 해서 좋은 것이 아니다. 과량의 주형을 첨가하면 비특이적 증폭이 일어나기 쉽고, PCR의 "SN 비"가 낮아진다. 반응계에 첨가하는 DNA의 양은 100 μ l 당 0.1 μ g이하로 낮추는 것이 무난하다. 포유류의 genome DNA처럼 그 크기가 크고 복잡성이 높은(단위기질당 mol수가 적다) 경우일지라도, 0.1 μ g의 주형으로 single copy의 유전자도 충분히 검출할 수 있다. 특히 주의해야 하는 주형 DNA 용액에 함유된 buffer의 성분이 PCR 반응액의 조성을 바꾸는 것이다. TE로 녹인 DNA의 경우는 통상 PCR 반응액 총량의 1/10까지 넣어도 PCR에는 큰 영향을 주지 않으므로 개의치 않아도 된다^{*1}.

그러나 역전사반응으로 합성한 DNA와 같이 어떠한 효소 반응을 실시하여 조제한 DNA를 주형으로 이용하는 경우에는 DNA 용액에 함유된 Mg^{2+} 나 dNTP의 양을 무시할 수 없으므로 주의해야 한다. RT-PCR의 경우에 사용하는 주형 DNA 용액은 50 μ l의 PCR 반응액 당 최고 1 μ l까지만 넣어 주는 것이 바람직하다.

*1 TE의 조성은 10 mM Tris, 1 mM EDTA이므로, 이것을 PCR 반응액에 1/10까지 첨가하면 표준적인 PCR 반응액에서 Tris 농도는 10 mM에서 11 mM로, Mg^{2+} 농도는 1.5 mM에서 1.4 mM로 변하지만, 이 정도의 변화는 PCR 반응에 영향을 미치지 않는다.

(5) 반응계 용량

통상적인 heat block 방식의 DNA 증폭장치는 0.5 μ l의 microtube로 최고 100 μ l의 반응액을 이용하도록 설계한 경우가 많다. 이보다 용량이 많으면 heat block의 온도변화가 반응액까지 전달되지 않으므로 피하는 것이 좋다. 한편 PCR 반응액은 용액을 조제하는 첫 단계에서 master mix를 준비하여 조성을 정확하게 조정 후 분주함으로써 반응액 양을 줄일 수 있다. 필자의 경우는 7 μ l의 반응액량으로도 문제없이 PCR을 실시하였다.

3. Agarose Gel Electrophoresis에 의한 확인

PCR 산물의 검출은 통상 agarose gel electrophoresis와 EtBr 염색으로 한다. PCR과 관련하여 전기영동을 할때의 주의사항은 다음과 같다.

- ① 통상의 단일밴드를 얻는 PCR의 경우, 단편의 검출에는 수 μ l의 전기영동으로 충분하다. 반면에 background가 되는 복수의 밴드가 있고 그 중 목적밴드를 보고자 하는 경우는 10 μ l 정도의 시료를 영동한다.
- ② DNA의 크기와 agarose의 농도에 따라서는 BPB 또는 XC 밴드와 중첩하여 검출하기 곤란한 경우도 있다. 이 경우에는 한 쪽의 색소를 넣지 않은 gel loading buffer를 만들어 사용한다.
- ③ PCR 반응액중의 DNA양은 많은 것이 아니므로, 전기영동전에 EtBr을 첨가한 gel을 사용하더라도 DNA가 신속하게 EtBr로 포화되어 비교적 정확한 크기를 추정할 수 있다. 오히려 EtBr이 들어 있는 gel로 소량의 DNA를 효과적으로 검출할 수 있어, 저분자의 검출에는 유리하다. 이 경우에는 전기영동 buffer에도 같은 농도의 EtBr을 넣어, 양극쪽 gel의 EtBr이 음극쪽으로 이동하여 저분자 DNA를 볼 수 없게 되는 현상을 방지해 주는 것이 좋다. EtBr을 넣은 4% agarose gel(buffer

: 1×TBE)를 이용하여 110 bp DNA를 약 10 bp의 작은 차이로 정확하게 검출한 예를 그림 2에 나타내었다.

- ④ 시료를 gel에 loading할 때 tip 속에 mineral oil이 혼입되면 시료가 떠버리는 경우도 있으므로 주의해야 한다. 특히 정량성이 문제가 되는 경우는 시료의 부분적인 소실도 치명적이므로 신중을 기해야 한다.

4. Positive Control과 Negative Control

각 PCR 실험에 있어서 무엇보다도 중요한 것은 positive control과 negative control을 확실히 알고 있어야 한다는 점이다. 간혹 positive control을 준비하지 않는 연구자도 있다. 여러번 반복하여 절대 자신을 가지는 실험에 관해서는 positive control을 준비하지 않아도 되지만, 처음하는 실험으로 결과를 예측하기 어려운 상황에서는 반드시 준비하여야 한다*1.

특히 PCR은 극히 미량의 DNA를 검출하는 기술이므로, 통상의 실험에서는 문제가 되지 않을 수 있는 DNA의 오염 유래의 잘못된 결과를 얻을 수 있으므로 밴드가 오염 DNA 유래가 아니라 시료에서 유래한 것임을 확인하기 위한 negative control도 중요하다. 또 PCR이 확실하게 성공한 것임을 알 수 없는 경우에도 모든 시료에서 밴드가 검출되지 않았을 때는 해석이 곤란하므로 실험의 실패 가능성을 배제하는 의미로서 positive control을 준비해야 한다*2.

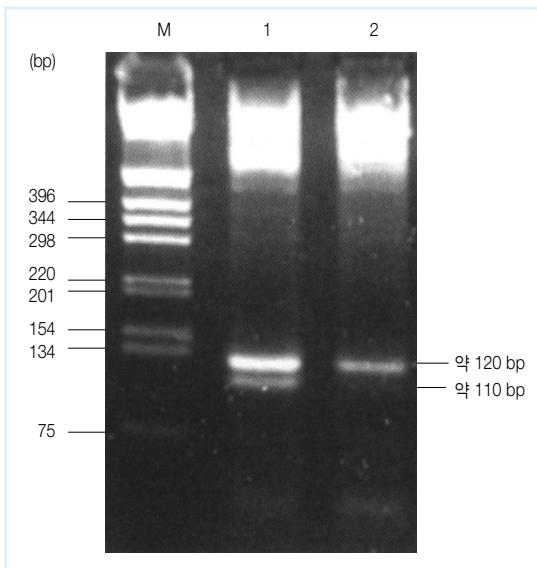


그림 2

Degenerate PCR로 110 bp(추정) 단편을 cloning하였다. 시료 1에서는 2개의 후보 단편을 얻었고 계산에 따라 각각 110 bp와 120 bp로 추정하였다. 염기서열 분석 결과, 예상대로 110 bp의 밴드가 목적 밴드였다.

*1 이러한 접근 태도로는 실험에 실패함으로써 결과적으로 절약한다는 것이 오히려 시간과 연구비의 낭비를 일으키는 경우가 더 많다.

*2 “아무래도 이 유전자는 발현하지 않는 것 같습니다.” 등의 말을 쉽게 해서 안된다. 그 primer의 최적반응 조건을 모르는 상황에서는 그렇게 말할 수 없을 뿐만 아니라, 적어도 그 primer로 PCR이 되지 않는다는 이유만으로 “유전자가 발현하지 않는다는 것”을 증명할 수는 없다. 이 경우 조건검토에 사용하는 positive control로는 그 primer의 목적단편을 확실하게 가지고 있는 것을 사용해야 한다.

(1) Negative Control

Negative control로서는 통상 반응액의 조제에 이용하는 증류수를 시료 DNA(주형 DNA) 대신 첨가하는 것이 좋다. Transgenic animal의 검출이나 자웅의 판정을 위해 PCR을 이용하는 경우에는 그 목적단편을 절대 가지고 있지 않는 genome DNA를 쉽게 입수할 수 있으므로 그것을 negative control로 이용하면 된다. 또 RT-PCR의 경우에는 사용한 RNA 시료에 genome DNA가 혼입되어 있지 않음을 확인하기 위한 negative control로서 역전사반응시에 역전사효소를 첨가하지 않고 동일한 조작을 실행한 RNA 시료를 주형으로 하여 PCR을 실시하는 것이 좋다.

(2) Positive Control

PCR산물의 밴드를 관찰할 수 없을 때 주형 DNA가 존재하지 않았는지 또는 반응이 이루어 지지 않았는지를 알 수 없을 때는 대처할 방법이 없다. 이와 같은 경우에 정보를 얻을 수 있게 해 주는 것이 positive control이다. 여기서는 세 가지 측면에서 positive control의 의미에 관해 설명한다.

① 반응의 positive control

어떤 virus나 세균이 검체에 존재하는지의 여부를 PCR로 검정하는 경우와 같이 특정 DNA의 존재/비존재를 검정할 때에 필요한 것이 positive control이다. Negative 결과가 나왔을 때에 그 결과가 단순히 잘못된 실험으로 발생한 것인지를 확인할 필요가 있다. 이를 위한 positive control로는 이미 PCR 반응을 해 보았던 primer와 시료 세트를 활용한다. 그 때에 조제한 시약과 DNA 증폭장치를 사용하였음에도 불구하고 이 positive control이 증폭되지 않으면 효소의 실활이나 thermal cycler의 파일 선택 오류 등 단순 오류를 의심해 보아야 한다. “어떤 검체에 DNA가 검출되지 않았습니까?”라는 것을 논문으로 주장할 생각이라면, 심사위원이 positive control을 요구할 수도 있다.

② 시료의 positive control

(1)에서 확인한 시약, primer, 반응조건을 이용하여 PCR을 하였음에도 밴드가 나타나지 않았고, 그때 “이 시료에는 목적단편이 들어 있지 않다”라고 생각한다면 다른 확인조치를 강구해보아야 한다. 이 경우에는 시료 DNA를 잘못 조제한 경우를 생각해 봐야 한다. 이를 조사하려면, 이미 확실히 증폭이 확인된(다른 시료로 증폭한 적이 있는) 별도의 primer로 그 시료에 목적단편을 반드시 함유하는 것을 선택하여 positive control로 사용한다. 이 positive control을 검출함으로써, 문제의 시료에는 적어도 PCR의 주형 DNA가 함유되어 있음을 확인할 수 있다. 자주 실시하는 예로서 RT-PCR로 유전자의 발현을 조사할 때에 동일한 1st strand cDNA의 일부를 주형으로 하여 β -actin이나 해당개 효소의 발현을 positive control로 하여 조사하는 것을 들 수 있다. 이 예에서는 역전사반응이 확실히 진행되었는지를 확인 할 필요가 있었기 때문이다.

③ Primer의 Positive Control

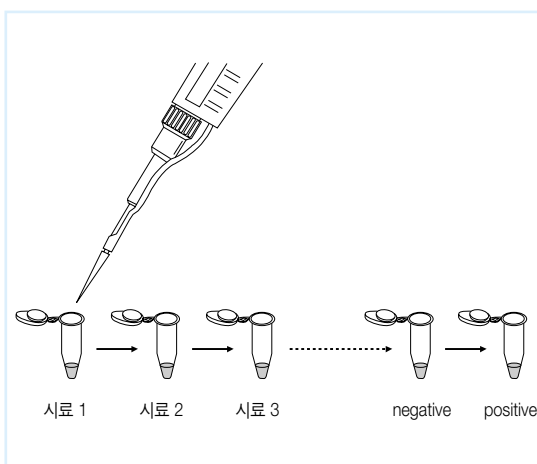
새로운 primer를 디자인하여 RT-PCR을 실시하여도 증폭이 일어나지 않는 경우에는 어떻게 해야 할까?

“선생님, 아무래도 이 유전자는 발현되지 않는것 같아요.” 등이라고 선불리 말하면 안된다. 그 primer의 최적의 반응조건을 모르는 상태에서 그런것을 말할 수도 없고, 적어도 그 primer로 PCR 증폭이 되는지를 확인하지 않은 상태에서는 “유전자가 발현하지 않는 것”을 증명할 수 없다. 이 경우의 조건검토에 사용하는 positive control은 그 primer의 목적서열을 가지고 있는 것이 확실한 DNA 이다.

“* * *는 그 유전자를 발현하고 있으므로 조건검토에 사용해야”라는 말을 들은 후 바로 cDNA를 만들어 반응을 해 봤지만 잘 되지 않았다. 무책임한 선배로부터 “primer의 설계를 잘못한 것이 아니냐?”라는 말을 들은 후 바로 다른 primer를 주문하니 교수님은 화를 내면서 “positive control로 확인해 봤느냐?”라고 얘기할 수 있다. 이 경우 positive control의 의미는 애매하다. 새로운 primer로 PCR을 할 때는 엄밀한 의미에서 positive control을 가질 수 없으므로 “이렇게 많은 반응조건을 검토했지만 안 되었습니다.”라고 얘기 했을 때 “그사이 너의 시료 박스가 하루종일 책상위에 놓여져 있었는데 RNA는 괜찮은 거냐?”라고 말하여 다시 확인하여보니 아주 소량으로 오염된 RNase에 의해 RNA가 분해되어 전혀 보이지 않았다.

(3) 반응액 조제 순서

Control이 정확하게 기능하기 위해서는 시료나 control의 반응액을 조제하는 순서에도 주의할 기울여야 한다. 시료의 조제를 아래의 그림과 같이 시료계열 → negative control → positive control의 순서로 하면 시료의 조제 도중에 일어나는 오염은 negative control로 검출되거나, positive control이 시료에 혼입하는 가능성도 배제할 수 있으므로 양자가 모두 기능할 수 있게 된다. 이 방법을 활용한다면, 예를 들어 positive control이 혼입함으로써 시료의 오염이 일어나 발생하는 오판 불가할 비극을 미연에 방지할 수 있다.



5. 미량 DNA 시료의 조제법

- 말초혈의 genotyping을 예로-

임상 생검표본이나 말초혈 등의 미량 시료로부터 DNA를 추출하여 PCR로 해석하고자 할 때는 이를 위한 시료의 조제(DNA 추출)은 어떻게 하는 것이 좋을까?

PCR을 위한 특별한 DNA 추출법이 존재하는 것은 아니지만, 통상의 방법으로도 좋다고 했을 때 초심자는 어떤 것이 통상의 방법인지를 판단하기 힘들다. 여기서는 말초혈로부터 genome DNA를 추출한 후 PCR로 single copy 유전자를 증폭하는 방법을 설명한다. Genome DNA의 추출은 Proteinase K를 이용하는 것이므로 기타 미량의 시료에 대해서도 동일하게 적용할 수 있다. 이 방법은 필자가 mouse의 골격이식 성립의 검정에 이용한 것이다. 생후 수일의 신생 nude mouse에 동일한 계통의 골격을 복강주사로 이식한 후 이식의 성립을 Y 염색체상의 정소 결정유전자인 *Sry*를 PCR로 조사하였다. 이 실험에서는 방사선조사를 하지 않으므로 말초혈속에는 XX recipient 백혈구와 XY donor 백혈구가 혼재하며, 획득한 DNA 시료중 목적단편은 haploid genome 당 0.5 copy이하로 존재한다. 따라서, 통상 haploid 당 1 copy의 유전자를 조사하기 위해 응용하더라도 우선은 문제가 없을 것이다. 단 mouse와 사람은 각기 다른 숫자의 말초혈 백혈구를 가지고, 또 증폭하는 유전자의 종류에 따라라도 증폭효율이 다르므로 이 방법을 반드시 적용할 수 있는 것인지는 필자도 단언할 수 없으나, 최선의 방법으로서 소개하고자 한다.

(1) 준비

• DNA 추출 buffer

| | |
|--------|-----------------|
| 150 mM | NaCl |
| 10 mM | Tris-HCl(pH8.0) |
| 10 mM | EDTA |
| 0.1% | SDS |

• Proteinase K stock 용액

평균수로 20 mg/ml이 되도록 녹인 stock 용액을 만들어 -20℃에서 보존하되 동결용해를 반복하지 않도록 분주해 둔다. 이 stock은 100배 농도의 것이다.

• PCI

Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol
= 25 : 24 : 1

- 3 M sodium acetate
- 100% ethanol
- 70% ethanol
- TE buffer

(2) 방법

① (검체수+1) × 100 μ l의 Proteinase K 용액을 아래의 조성으로 만든다.

최종농도

- DNA 추출 buffer _____ ml
- Proteinase K stock 용액 _____ μ l 200 μ g/ml

② 1.5 ml microtube에 Proteinase K 용액을 100 μ l 씩 분주한다.

③ 한 방울(약 5~10 μ l)의 말초혈을 취하여 응고하기 전에 신속히 2)단계의 proteinase K 용액에 현탁한다*1.

*1 백혈구에 다량 함유되어 있는 heme(hemoglobin에 결합하는 철색소)이 PCR을 저해하므로 우선 혈구로부터 적혈구를 제거하도록 되어있는 protocol이 많으나, 여기서는 소량의 혈액을 사용하므로 세포의 분획은 사실상 불가능하며, 나중 단계에서 heme을 제거할 수 있으므로 걱정하지 않아도 된다.

④ 37℃에서 2시간동안 배양한다.

(_____ : _____ ~ _____ : _____)

⑤ PCI를 100 μ l 첨가하고 뚜껑을 확실하게 닫는다.

⑥ Vortex로 tube내의 내용물을 잘 혼합한다*2.

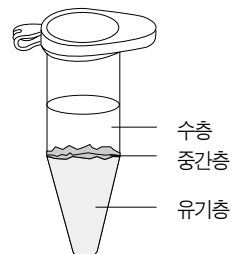
*2 이 phenol/chloroform의 처리로 단백질들은 제거되며, heme도 유기층에 묻혀 제거된다.

⑦ 실온에서 15,000 rpm, 5분간 원심분리한다.

(_____ : _____ ~ _____ : _____)

⑧ 위에서부터 수층, 아주 적은 중간층(잘 보이지 않을 수도 있다), 유기층*3으로 분리되는데, 수층을 새로운 microtube로 옮긴다.

*3 유기층은 heme로 인해 착색되므로 구분하기 쉽다.



⑨ ⑤~⑧단계를 반복한다*4.

*4 필자 등은 heme을 완전히 제거하기 위해 phenol/chloroform 처리를 2회 실시하지만, ⑨단계에서는 생략해도 좋다.

⑩ 10 μ l의 3 M sodium acetate를 첨가한다.

⑪ 250 μ l의 100% ethanol을 첨가한다.

⑫ 실온에서 10분간 방치한다.

(____ : ____ ~ ____ : ____)

⑬ Microtube를 4℃에서 15,000 rpm, 15분간 원심분리하여 핵산이 존재하는 pellet을 회수한다.

(____ : ____ ~ ____ : ____)

⑭ 상청을 micropipette 또는 aspirator로 제거한다.

⑮ 500 μ l의 70% ethanol을 첨가하고 vortex로 가볍게 교반한다.

⑯ Microtube를 4℃에서 15,000rpm, 5분간 원심분리하여 pellet을 회수한다.

(____ : ____ ~ ____ : ____)

⑰ 상청을 micropipette 또는 aspirator로 제거한다*5.

*5 70% ethanol 세척 후에 DNA pellet은 떨어지기 쉬우므로 주의할 것

⑱ Microtube를 paper towel위에 거꾸로 세워 수분을 완전히 제거한다.

⑲ 원심건조기로 침전을 건조한다.

⑳ 10 μ l의 TE buffer로 녹여 DNA 시료로 사용한다*6.

*6 PCR에는 이 중 1 μ l만 사용해도 충분하다.

5. PCR

여기서는 본 고에서 설명한 내용대로 실시한 실험 예를 들어 본다. 어디까지나 일반적인 예이므로 자신의 실험계에서는 변형하여 사용하여도 된다.

(1) 준비

- Primer
- 주형 DNA 용액
- 10× PCR buffer
- MgCl₂ (25 mM stock solution)
- dNTP Mix (2.5 mM stock solution)
- Taq polymerase (5 U/ μ l)
- Mineral oil

(2) 방법

① PCR tube에 아래의 조성과 같이 반응액을 조제한다*1.

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| H ₂ O | _____ μ l |
| 10× PCR buffer | 10 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM stock) | 6 μ l (1.5 mM) |
| dNTP Mix (2.5 mM stock) | 8 μ l (0.2 mM) |
| Primer-1(_____ μ M stock) | μ l (0.5 μ M) |
| Primer-2(_____ μ M stock) | μ l (0.5 μ M) |
| 주형 DNA 용액 | 1 μ l |
| Taq polymerase (5 U/ μ l)*2 | 0.5 μ l (2.5 U/100 μ l) |
| total | 100 μ l |

*1 여기서는 1검체만 실시하는 것을 고려하여 총량을 100 μ l로 하였으나, 다 검체의 경우는 분주조작으로 검체당 용량을 낮추어도 좋다.

*2 Hot start의 경우는 효소를 나중에 첨가한다.

② 50~100 μ l의 mineral oil을 넣는다*3.

*3 액면이 증발하지 않도록 보호해 준다.

③ 처음의 열변성 시간만 2~5분으로 길게 하고, 그다음부터는 통상의 PCR을 실시한다*4. Cycle 수는 처음에는 25~30회 정도로 시험해 본다.

*4 경우에 따라서는 처음에는 낮은 annealing 온도로 수 cycle 실시하고, 나중에는 높여서 할 수도 있으므로 여기서는 2개의 program을 연결할 수 있도록 표시하였다. 통상은 동일한 program을 25~30 cycle 정도 반복한다.

변성 : _____℃ × _____분



변성 : _____℃ × _____분
annealing : _____℃ × _____분
신장반응 : _____℃ × _____분

} cycle



변성 : _____℃ × _____분
annealing : _____℃ × _____분
신장반응 : _____℃ × _____분

} cycle



신장반응 : _____℃ × _____분



보존 : _____℃

- ④ PCR 반응액 중 5~10 μ l를 agarose gel로 전기영동하여 목적 단편이 증폭되었는지를 확인한다.
- ⑤ 만약 밴드가 보이지 않는 경우에는 새로운 반응액을 만

들어, PCR 종료후의 1 μ l 용액을 주형으로 첨가하여*, 15~30 cycle의 2nd PCR을 추가로 해 본다.

*5 이것으로 1/50~1/100배로 희석된다.

7. Troubleshooting

(1) 증폭되지 않는다

- | | |
|---------------------------------------|---|
| ① 저분자로 primer dimer 같은 형태가 보인다. | → (2)로 |
| ② 잘 보면 이상한 band가 있다. | → (2)로 |
| ③ 반응의 positive control이 증폭되지 않는다. | |
| i) 동결하였던 stock 용액은 해동후 잘 혼합하였는가? | |
| ii) Mg^{2+} 의 농도는 적절한가? | → 10× buffer에 Mg^{2+} 가 들어있는지의 여부를 확인 |
| iii) dNTP의 농도는 적절한가? | → Stock 농도 확인 |
| iv) 반응용기와 heat block의 밀착성은 좋은가? | → Mineral oil이나 glycerol을 heat block과 tube 사이에 넣어 본다. |
| v) Taq polymerase는 실패하지 않았는가? | |
| ④ 시료의 positive control이 증폭되지 않는다. | |
| i) (1)-③의 모든 고려사항에 적당한가? | → 그렇지 않은 경우는 우선 (1)-③으로 |
| ii) 주형 DNA는 적절하게 조제하였는가? | → DNA 재조제 |
| iii) RT-PCR의 경우, 역전사반응을 확인한다. | |
| ⑤ Primer의 positive control이 증폭되지 않는다. | |
| i) (1)-④의 모든 고려사항에 적당한가? | → 그렇지 않은 경우는 우선 (1)-③으로 |
| ii) PCR 횟수를 늘려 본다. | |
| iii) Primer의 농도측정은 정확하였나? | → Primer 용액의 O.D.값을 구한 후 mol 농도를 계산한다. |
| iv) Annealing 온도는 정확하였나? | → Tm을 계산하여 본다. |
| v) 열변성은 충분하였나? | → 94℃ × 1분을 우선 시험해 본다. |
| vi) Annealing 온도를 낮추어 본다. | |
| vii) 신장반응 시간을 늘려 본다. | |
| viii) Mg^{2+} 의 농도를 바꾸어 본다. | |
| ix) Primer를 다시 디자인한다. 비용은 드나 확실한 방법임. | |

(2) 비특이적 증폭이 일어난다.

- | | |
|--|---------------------|
| ① Primer의 농도측정은 정확하였나? (0.5 μ M이 표준) | → 정확한 경우 (2)로 |
| ② Primer의 농도를 낮추어 본다. (0.2 μ M 정도까지) | |
| ③ 과량의 주형 DNA를 사용하지 않았나? | → 주형 DNA의 양을 줄여 본다. |

④ 과량의 효소를 사용하지 않았나? (2.5 U / 100 μ l가 표준)

⑤ Annealing 온도를 높여 본다.

⑥ 신장반응 시간을 줄여 본다.

⑦ Cycle 수를 줄여 본다.

⑧ Mg^{2+} 의 농도를 바꾸어 본다.

⑨ Hot start법으로 실시한다.

⑩ Primer를 다시 디자인한다. 비용은 드나 확실한 방법임.

⑪ Nested PCR을 실시한다.

(3) 재현성이 없다.

① 동결하였던 stock 용액은 해동 후 잘 혼합하였는가?

② 반응용기와 heat block의 밀착성은 좋은가?

→ Mineral oil이나 glycerol을 heat block과 tube 사이에 넣어 본다.

③ 오염이 일어나지는 않았는가?

→ (4)로

(4) Negative control이 증폭한다.

① RT-PCR에서 negative control이 증폭하였다.

→ 역전사반응전에 RNase free DNase를 처리한다. DNA 오염을 제거.

② 시약에 DNA가 오염되었을 가능성이 있다.

i) Aerosol 방지 filter를 부착한 tip을 사용한다.

ii) Stock 용액을 넣은 후 DNA 시료를 취급한다(주형 DNA는 마지막에 넣는다).

iii) Polyglove를 사용한다.

iv) Hood 속에서 작업한다.

→ UV를 15분간 조사하면 hood내의 오염된 DNA는 분해되므로 오염을 방지할 수 있다.

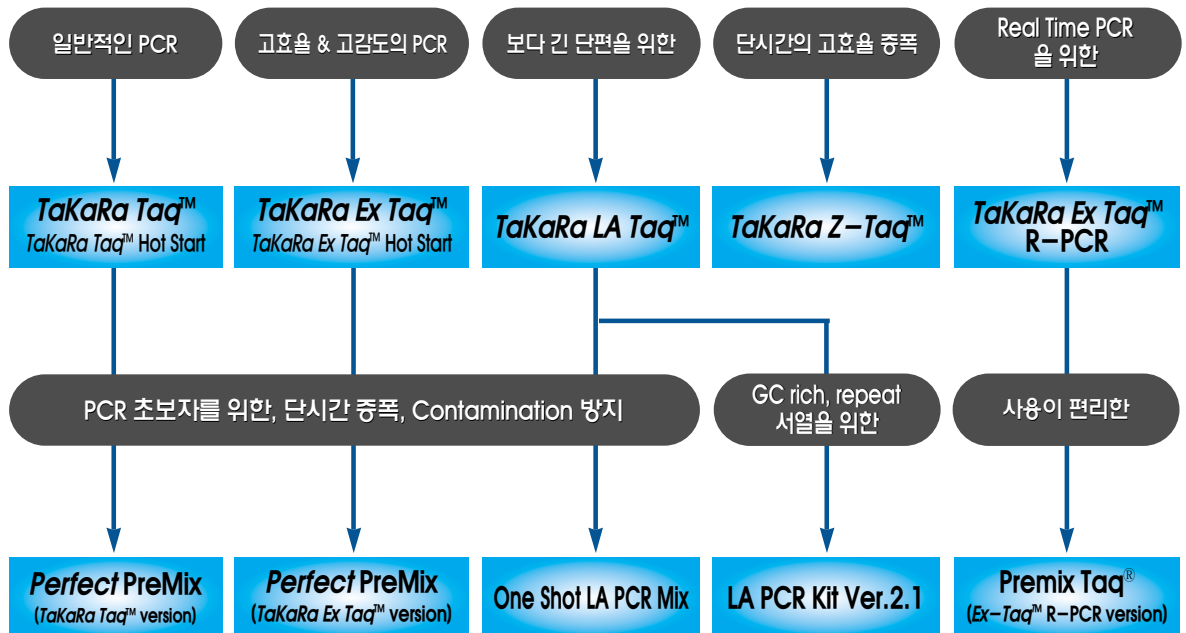
v) Nondisposable 기구를 세정한다.

→ 0.1 N 정도의 염산에 적시거나 산화작용을 하는 세정제로 씻는 등 DNA를 분해하는 조작을 추가로 한다. DNA는 약간의 열처리로는 분해되지 않음에 유의할 것.

vi) PCR 산물을 분석(전기영동)하는 장소를 격리한다.

→ PCR 산물은 가장 확실한 주형으로 작용하며 그 mol 수도 막대하다. Micropipette을 구분하여 사용하는 것도 좋다.

The Best PCR Enzymes



사용구분의 기준

| 증폭길이 | <i>TaKaRa Taq</i> TM <i>Pyrobes</i> TM DNA Polymerase | | < | <i>TaKaRa Ex Taq</i> TM <i>TaKaRa Z-Taq</i> TM | | < | <i>TaKaRa LA Taq</i> TM |
|-------------------|---|------------------------------------|---|---|---|---|---|
| λ DNA | | | | | | | |
| 권장 증폭길이 | ~6 kbp 정도 | | | ~20 kbp 정도 | | | ~35 kbp 정도 |
| 증폭가능 길이 | ~12 kbp 정도 | | | ~30 kbp 정도 | | | ~48 kbp 정도 |
| Human genomic DNA | | | | | | | |
| 권장 증폭길이 | ~2 kbp 정도 | | | ~10 kbp 정도 | | | ~20 kbp 정도 |
| 증폭가능 길이 | ~4 kbp 정도 | | | ~20 kbp 정도 | | | ~30 kbp 정도 |
| 정확도(fidelity) | <i>TaKaRa Taq</i> TM | < | <i>TaKaRa Ex Taq</i> TM | < | <i>TaKaRa LA Taq</i> TM | < | <i>Pyrobes</i> TM DNA Polymerase |
| | | | <i>TaKaRa Z-Taq</i> TM | | | | |
| 증폭효율 | <i>TaKaRa Taq</i> TM | ≒ | <i>Pyrobes</i> TM DNA Polymerase | < | <i>TaKaRa LA Taq</i> TM | ≤ | <i>TaKaRa Ex Taq</i> TM <i>TaKaRa Z-Taq</i> TM |
| 반응속도 | <i>TaKaRa Z-Taq</i> TM 이 <i>TaKaRa Taq</i> TM 보다 5배 더 빠르다 | | | | | | |
| 제품명 | <i>TaKaRa Taq</i> TM | <i>TaKaRa Ex Taq</i> TM | <i>TaKaRa LA Taq</i> TM | <i>TaKaRa Z-Taq</i> TM | <i>Pyrobes</i> TM DNA Polymerase | | |
| Code | R001 | RR001 | RR002 | R006 | R005 | | |

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어질수록 필요한 주형 DNA의 양이 많아지고 또 PCR 조건도 엄밀해진다.

PCR 산물의 Subcloning

I. PCR 산물의 Subcloning

II. TA Cloning

I. PCR 산물의 Subcloning

1. PCR 산물 Cloning시의 문제점

PCR로 증폭한 단편을 plasmid에 subcloning 할 때에는 다음과 같은 문제점이 있다.

[문제점 1 : 단편의 5' 말단이 인산화 되지 않는다.]

통상 DNA 합성기로 합성한 oligonucleotide에는 5' 말단에 인산기가 붙어 있지 않아 그 oligonucleotide를 primer로 하여 합성한 PCR 산물도 5' 말단에 인산기가 없으므로 그대로는 ligation 기질로 사용할 수 없다(그림 1).

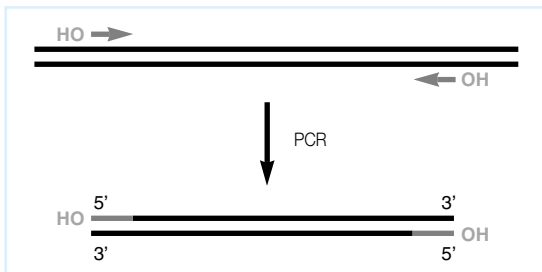


그림 1

통상의 oligonucleotide를 primer로 증폭한 PCR 산물은 5' 말단에 인산기가 없다.

물론 ligation하는 상대측 DNA의 5' 말단이 인산화 되어 있으면 DNA의 한쪽 가닥은 연결될 수 있지만 vector에 넣을 때는 vector의 self ligation을 방지하기 위해 미리 vector를 탈인산화 하므로 ligation을 기대할 수 없다. 따라서 PCR 산물을 그대로 ligation 기질로 이용할 때에는 5' 말단의 인산화가 필요하다(그림 2).

[문제점 2 : 단편의 3' 말단이 돌출되어 있다.]

Taq polymerase는 일종의 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) 활성을 갖는다.

이 활성은 주형 DNA에 상보적인 DNA 가닥을 합성한 후 blunt end로 된 말단에 1염기의 nucleotide를 첨가하는 것으로 DNA extendase 또는 terminal extendase 활성이라고 한다. *Taq* polymerase가 이러한 활성을 갖고 있어 PCR 산물의 대부분은 3' 말단이 돌출하여 효율이 낮은 blunt end로서 cloning 효율은 현저하게 낮아진다(그림 3).

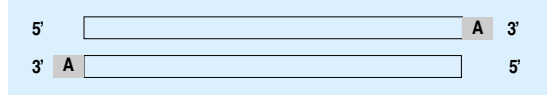


그림 3

PCR 산물은 *Taq* polymerase의 TdT 활성 때문에 3' 측이 1염기 돌출된 형태를 갖는다.

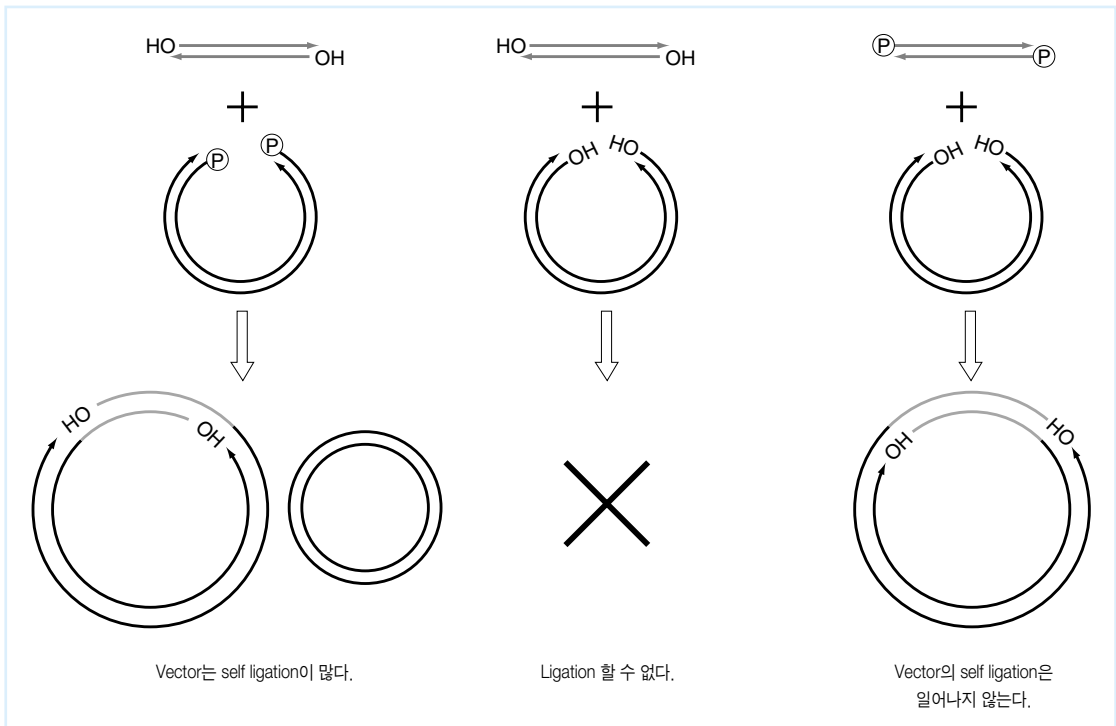


그림 2

2. Subcloning의 다양한 방법

앞에서 서술한 바와 같이 PCR 산물을 cloning할 때의 문제점을 해결하기 위해 여러 가지 방법이 고안되어 실용화되고 있다. 여기서는 실제 이용하는 실험법 중에서 일반성이 있다고 판단되는 제한효소 인식서열의 부가와 TA cloning법을 중심으로 자세히 설명하고 다양한 방법의 원리를 설명한다.

(1) Blunt End Ligation

PCR 산물을 cloning할 때에 우선적으로 선택할 수 있는 방법이지만 1. PCR 산물 cloning시의 문제점에서 서술한 것 모두가 문제시 된다.

① 5' 말단의 인산화

PCR 산물을 blunt end vector에 넣으려고 할 때 가장 먼저 생각해야 하는 것은 PCR 산물의 5' 인산화이다. DNA의 5' 말단을 인산화하는 polynucleotide kinase의 효율은 single strand 말단 \geq double strand 5' 돌출 말단 $>$ double strand 평활 말단 $>$ double strand 3' 돌출 말단의 순서로 낮아진다. PCR 산물의 대부분은 1염기의 3' 돌출 말단을 갖고 있어 인산화의 효율이 높지 않다. 따라서 이 방법으로 subcloning을 하고자 할 때는 PCR을 하기 전에 primer의 5' 말단 인산화 하는 것이 좋다. Primer의 인산화에는 polynucleotide kinase를 이용할 수도 있지만 oligonucleotide의 최종 합성 단계에서 인산화용 amidite를 이용하여 미리 인산화 oligonucleotide로 합성하는 것이 효율적이다.

② 말단의 평활화

또 한가지 중요한 점은 단편의 말단 형상이다. 1염기의 3' 돌출 말단을 가진 PCR 단편을 blunt end vector에 넣기 위해서는 말단의 평활화가 필요하다. 말단의 평활화에는 T4 DNA polymerase 등 3' \rightarrow 5' exonuclease 활성을 갖는 것을 dNTP와 함께 사용한다. *Taq* polymerase 뿐만 아니라 Klenow 효소를 포함한 대부분의 DNA polymerase는 TdT 활성을 갖는다(따라서 말단 평활화에 Klenow 효소를 이용하는 것은 그다지 좋은 방법은 아니다). T4 DNA polymerase와 *Pfu* polymerase는 TdT 활성을 갖지 않으므로 말단의 평활화에는 어느 것을 사용해도 좋다.

(2) 제한효소 인식서열의 부가

다음의 그림과 같이 5' 말단에 제한효소의 인식서열을 갖는 adaptor 서열을 부가한 primer를 만든다. PCR primer는 5' 말단쪽에 mismatch가 있어도 거의 문제가 없으므로 이 primer를 이용하여 PCR 한다. 얻은 PCR 산물은 양말단에 제한효소 인식부위를 갖고 있어 제한효소로 절단하면 5' 인산기를 가진 돌출 말단이 양쪽에 만들어진다. 이렇게 해서 얻은 PCR 산물은 탈인산화한 vector에 쉽게 넣을 수 있다. 또 2개의 primer에 다른 제한효소 인식부위를 부가해 두면 vector에 넣을 때 PCR 산물의 방향을 결정할 수 있으므로 편리하다.

이 방법을 이용할 때의 주의 사항은 이후에 설명하였다.

◆ *Taq* polymerase의 TdT 활성

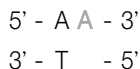
자료(STRATEGIES in molecular biology, Vol. 7, p. 8)에 따르면 *Taq* polymerase의 TdT 활성은 말단에 오는 nucleotide의 종류에 따라 다르다.

이 자료에 기초한 두가닥의 말단 구조를 아래에 표시하였다. 말단이 C 또는 G인 경우는 복수의 종류가 있지만 이 경우는 가장 왼쪽의 구조가 될 빈도가 높다.

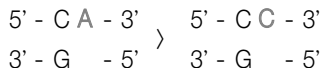
또 말단이 T인 경우는 T를 빼고 대신 A를 부가한다. 이 경우는 이론상 TA cloning vector가 잘 작동될 수 없지만 필자의 경험으로는 문제없이 cloning을 할 수 있었다.

Primer를 디자인할 때는 5' 말단이 A가 되지 않도록 하는 것이 좋다.

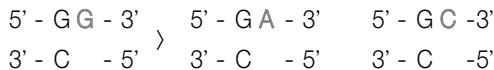
· 말단이 A인 경우



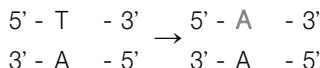
· 말단이 C인 경우



· 말단이 G인 경우



· 말단이 T인 경우



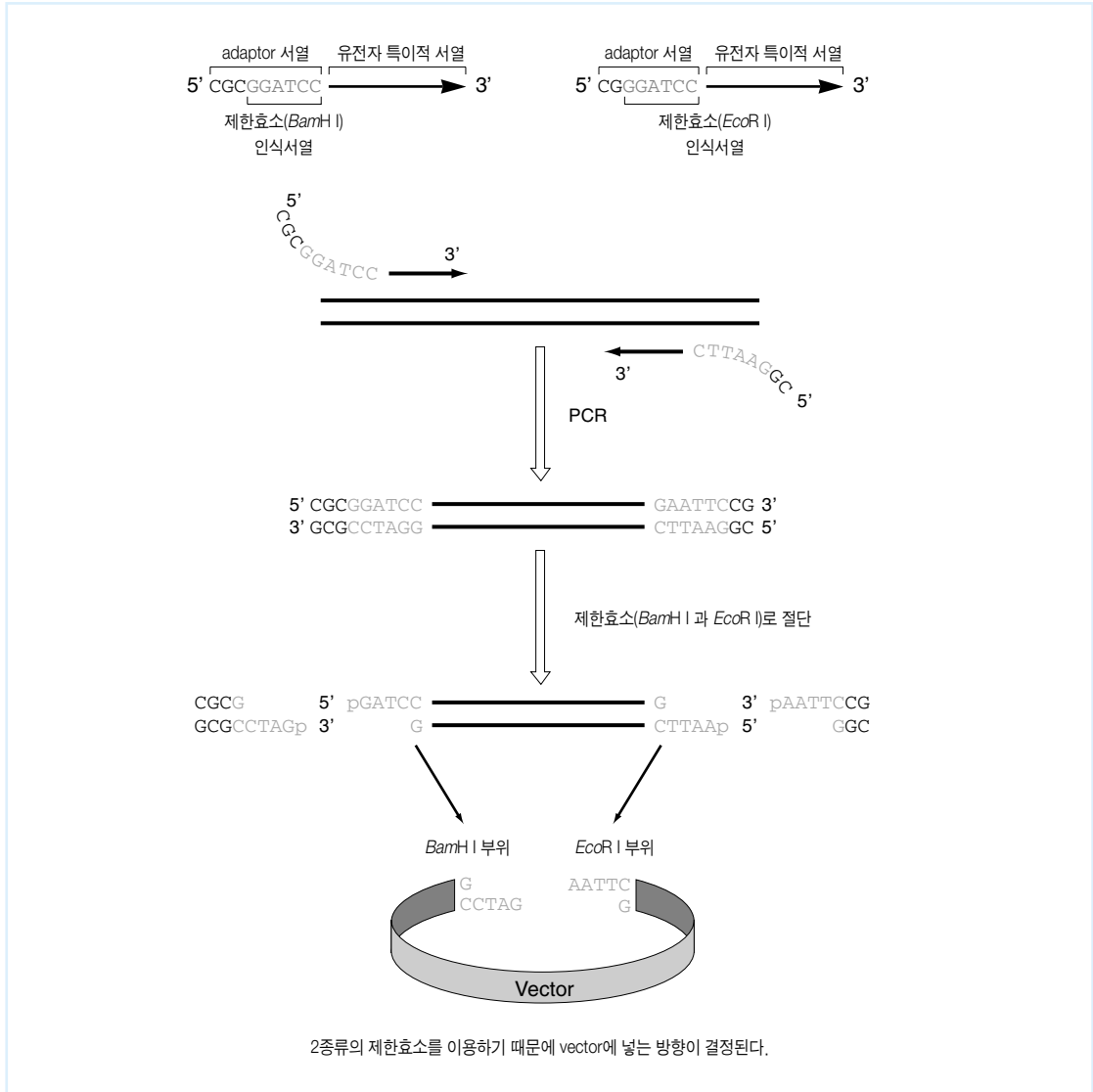


그림 4

① 여분의 nucleotide의 추가

제한효소는 linear strand DNA의 말단에 있는 인식서열은 절단하지 않는 경우가 있으므로 인식서열의 바깥쪽에 몇 base 정도 여분의 염기를 추가한다. 구체적으로 어떤 염기를 여분으로 추가해야 할지는 제한효소의 종류에 따라 다르지만 예를 들면 *Bam*HI의 경우, 그림 5의 A와 같이 인식서열의 바깥쪽에 2염기씩 튀어나온 oligonucleotide는 2시간 이내에 90% 이상이 절단되지만 그림 5의 B와 같이 1염기가 튀어나온 것은 20시간 반응하여도 25%밖에 절단되지 않는다.

- A) 5' - CGGGATCCCG - 3' ○
3' - GCCCTAGGGC - 5'
- B) 5' - GGGATCCC - 3' ×
3' - CCCTAGGG - 5'

그림 5

*1 위에 기재한 *Bam*HI의 date는 특정회사의 카다로그에 기초한 것이다. 각 회사의 카다로그만큼 좋은 교과서는 없으므로 적극적으로 활용하는 것이 좋다.

Oligonucleotide 내의 인식서열과 고분자 linear strand DNA 말단의 인식서열은 절단 효율에 있어 차이가 있으나 그 경우에도 oligonucleotide에서 절단할 수 있는 경우는 고분자 DNA라도 거의 동등하게 절단할 수 있다.

아래의 표 1은 oligonucleotide의 절단효율이 높은 효소에 한해서 정리한 것이다.

표 1 제한효소의 인식서열

| 효소 | oligonucleotide 서열 | 절단 효율(%) | |
|---------|-----------------------|----------|--------|
| | | 2시간 후 | 20시간 후 |
| Afl III | CCACATGTGG | > 90 | > 90 |
| | CCCACATGTGGG | > 90 | > 90 |
| Asc I | GGCGCGCC | > 90 | > 90 |
| | AGGCGCGCCT | > 90 | > 90 |
| Ava I | CCCCGGGG | 50 | > 90 |
| | CCCCCGGGGG | > 90 | > 90 |
| BamH I | CGGATCCG | 10 | 25 |
| | CGGGATCCCG | > 90 | > 90 |
| BssH II | TTGGCGCGCCAA | 50 | > 90 |
| Cla I | CCATCGATGG | > 90 | > 90 |
| EcoR I | GGAATTC | > 90 | > 90 |
| | CGGAATTCG | > 90 | > 90 |
| | CCGGAATTCGG | > 90 | > 90 |
| Kpn I | GGGGTACCC | > 90 | > 90 |
| | CGGGGTACCCG | > 90 | > 90 |
| Sac II | TCCCCGCGGGGA | 50 | > 90 |
| Sma I | TCCCCCGGGGGA | > 90 | > 90 |
| Spe I | GACTAGTC | 10 | > 90 |
| | CGACTAGTCG | 10 | > 90 |
| Stu I | AAGGCCTT | > 90 | > 90 |
| | GAAGGCCTTC | > 90 | > 90 |
| | AAAAGGCCTTTT | > 90 | > 90 |
| Xba I | GCTCTAGAGC | > 90 | > 90 |
| Xma I | CCCCCGGGGGG | 50 | > 90 |
| | TCCCCCGGGGGGTA | > 90 | > 90 |

제한효소의 인식서열을 음영으로 표시하였다.

② Tm의 추정값

PCR의 최초 2 cycle 동안은 제한효소의 인식서열을 포함하는 adaptor 부분은 primer의 annealing에 영향을 미치지 않으므로 Tm의 추정값은 adaptor 부분을 제외한 유전자 특이적 영역을 기준으로 계산한다. 3 cycle째 이후에는 adaptor 부분에 상보적인 서열이 합성되므로 실제의

annealing은 더욱 높은 온도에서 되지만 통상은 처음의 설정대로 하여도 문제는 없다.

(3) Uracil DNA Glycosylase를 이용한 Cloning

2.(2) 제한효소 인식서열의 추가에서 서술한 방법과 같이 유전자 특이적 서열 뒤에 adaptor 서열을 붙인다는 점은 같지만 adaptor 부분은 dUMP를 포함한 다음과 같은 서열로 한다.

Uracil을 포함한 adaptor 서열이 붙은 primer

5' CAUCAUCAUCAU → 3'

이 primer를 이용하여 얻은 PCR 산물은 primer에서 유래한 5' 말단 부분에 uracil를 함유하는 DNA가 된다. 이 DNA에 uracil DNA glycosylase(UDG)^{*1}가 작용하여 DNA에 포함된 uracil을 제거한다. 그 결과 생기는 탈염기 부위(AP site)는 약알칼리성 조건에서 쉽게 가수분해되어 3' 측에는 12염기가 긴 한가닥 영역이 형성된다.

BRL사에서 판매하는 UDG cloning vector는 이 한가닥 영역에 상보적인 영역을 포함하는 특수한 3' 돌출 말단을 갖고 있어^{*2}, PCR 산물과 쉽게 두가닥을 형성한다. 이 두가닥 영역은 37℃에서 안정하므로 ligation 하지 않고 직접 competent 세포에 도입하면 대장균내의 수복계로 결합되어 그대로 형질전환체를 얻을 수 있다. Insert를 포함하지 않은 vector의 self ligation은 이론상 있을 수 없으므로 얻어진 subclone은 insert를 가질 확률이 매우 높다.

이 방법은 조작이 간단한 반면에 특별한 adaptor 서열을 가진 primer가 필요한 것과 vector의 자체 제작이 불가능하다는 단점이 있다.

*1 uracil DNA glycosylase는 AP endonuclease와 같이 cytosin의 탈 amino화로 생기는 이상 염기인 uracil를 제거·수복하는 기능을 갖는다.

*2 이 3' 돌출부분의 서열은 vector에 따라 CATCATCATCAT과 CTACTACTACTA의 2종류가 있고 vector에 넣을 때에 PCR 산물의 방향을 결정할 수 있도록 되어 있다.

(4) TA Cloning

1. PCR 산물 cloning시의 문제점에서 서술한 바와 같이 Taq polymerase나 Tth polymerase는 평활말단에 1염기만 추가하는 TdT 활성을 갖지만 4종류의 nucleotide 전부를 동일한 확률로 추가하는 것이 아니라 A를 추가할 확률이 가장 높다. 따라서 대부분의 분자는 3' 말단에 A가 1염

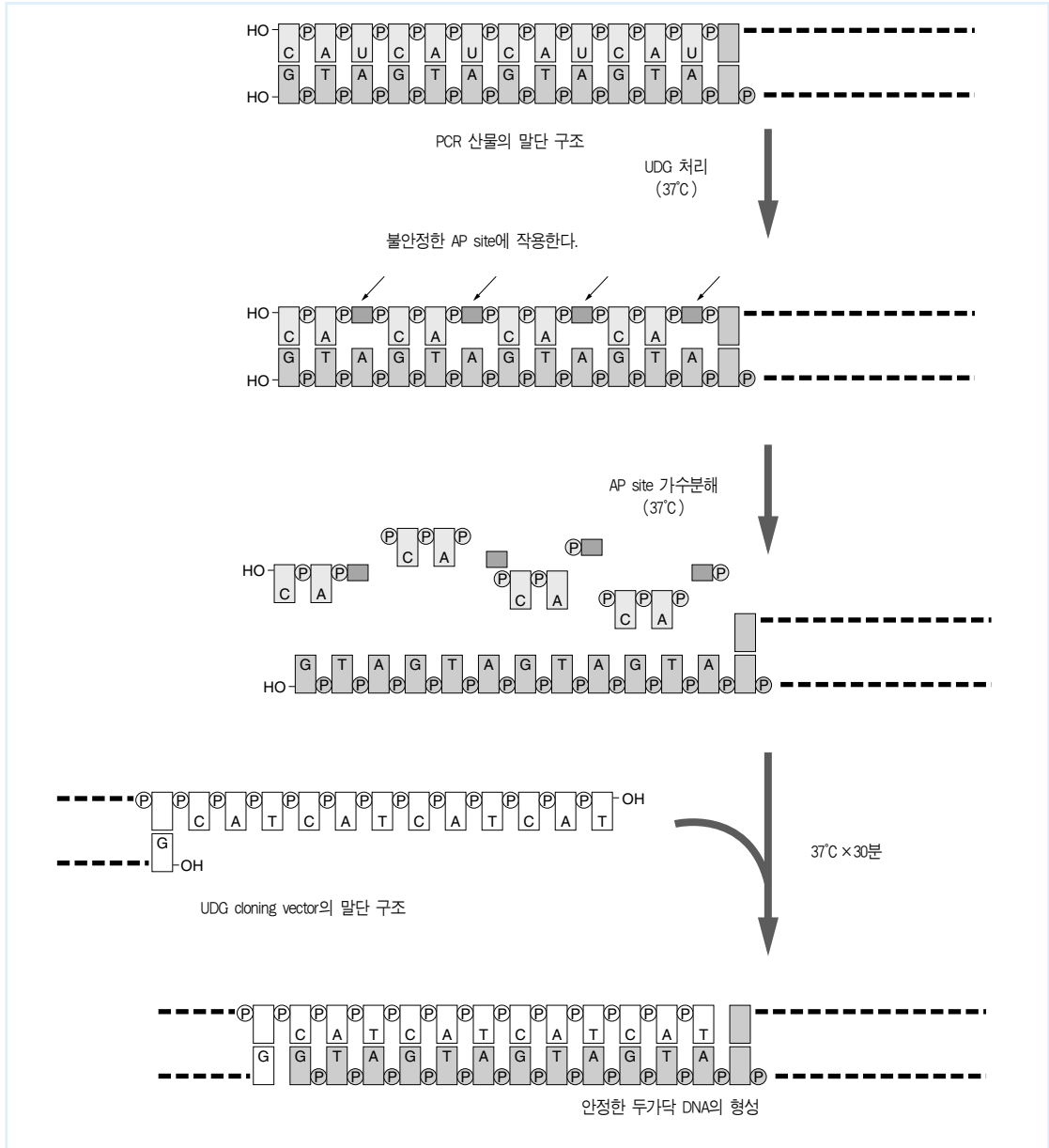


그림 6

기 돌출한 구조를 하고 있다. 이에 역으로 3' 측에 T가 1염기 돌출한 vector를 만들면 PCR 산물과 vector가 AT 수소결합을 하므로 쉽게 결합할 수 있다.

이 cloning법을 TA cloning이라 하며 전용 TA cloning vector가 다양한 회사에서 판매중이다(FOREX-T vector TaKaRa code BL001/BL002). 이 vector를 이용하면 PCR 산물을 더 이상 조작할 필요없이 쉽게 subcloning할 수 있어 애용되고 있으나 보통의 제한효소 처리로는 그

vector를 만드는 것이 곤란하므로 구매하는 것이 좋다. 그러나 이 vector와 같은 원리에 기초한 vector(T vector)를 특별한 시약을 이용하지 않고 자체 제작하는 방법은 이미 1991년에 발표되었고(Marchuk *et al. Nucl Acid Res* Vol.19, p. 1154, 1991)*1, "Red Book"의 애칭으로 유명한 "Current Protocols in Molecular Biology"에도 소개되었다. 본 고에서는 이 방법을 PCR 산물을 subcloning할 때의 표준적인 방법의 하나로 소개한다.

Taq polymerase는 4종류의 nucleotide가 공존할 때에는 대부분 A를 부가하지만 다른 nucleotide를 부가하는 활성이 전혀 없는 것은 아니고 dTTP만을 포함한 반응계에서는 충분한 시간을 주면 T를 1개씩 부가한다. 그래서 blunt end로 절단한 vector에 *Taq* polymerase와 dTTP를 작용시키면 T vector가 가능한 것이다.

이 vector는 3' 말단이 돌출되어 있어 self ligation이 일어나지 않고, 5' 말단에는 인산기가 붙어있어 인산화하지 않은 PCR 산물을 cloning할 수 있다. 또 PCR 산물에는 A가 돌출하고 있고 5' 말단에는 인산기가 없기 때문에 PCR 산물끼리의 ligation에 의한 concatamer 형성이 일어나지 않는다는 장점이 있다. 이 방법은 일단 vector를 대량으로 만들어 두면 PCR 산물에 어떤 수식을 하지 않고도 subcloning할 수 있으므로 매우 편리하다.

II. TA Cloning

1. T Vector의 조제

(1) 준비

- Plasmid vector
- PCI
- Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25 : 24 : 1
- *Taq* polymerase(5 U/ μ l)
- 10× *Taq* buffer
- dTTP(100 mM stock 용액)
- $MgCl_2$ (25 mM stock 용액)

(2) 방법

- ① 사용하는 vector의 multicloning site를 blunt end를

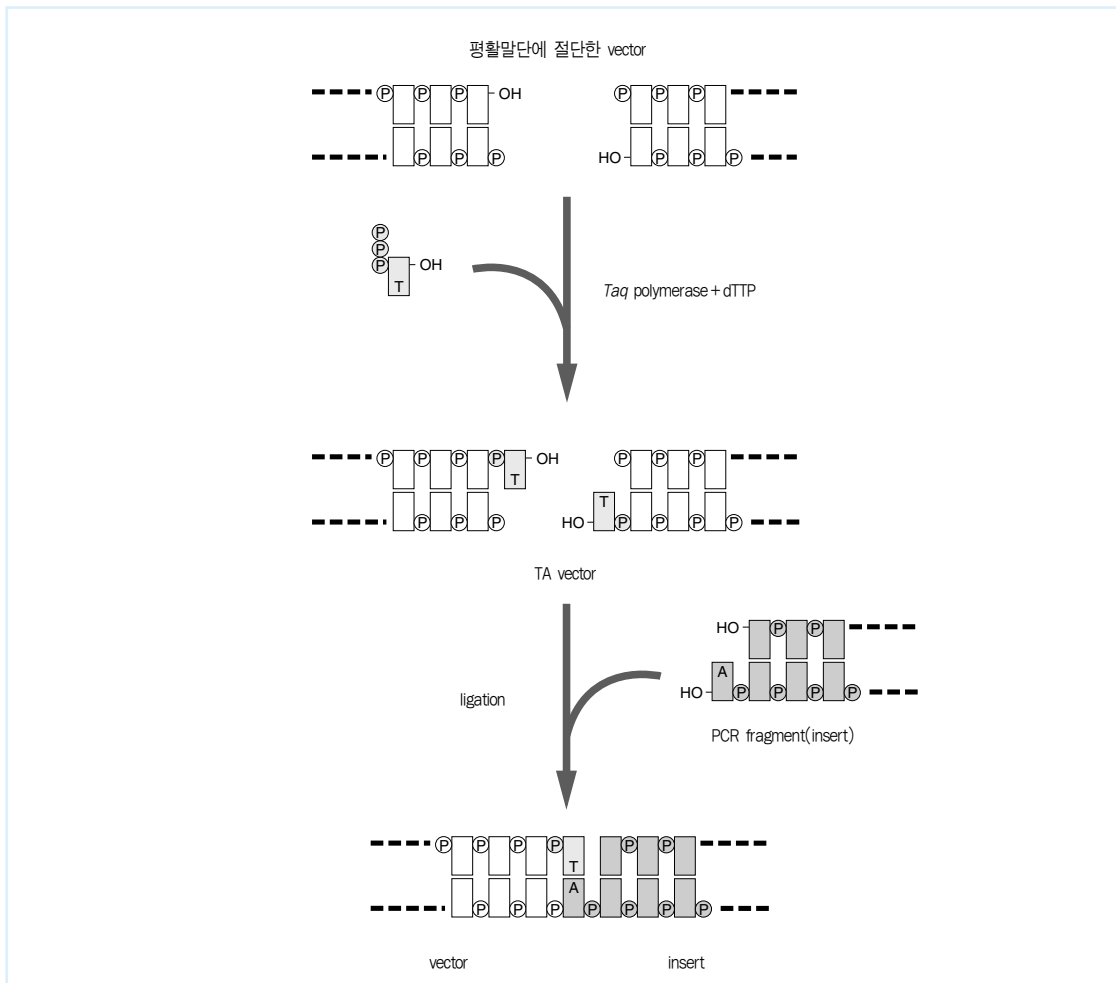


그림 7

형성하는 적당한 제한효소*1로 절단하여 직쇄형태로 만든다*2.

② Vector를 전기영동하여 linear strand 형태 III만을 gel에서 정제한다*3.

③ 0.5 ml의 microtube에*4 아래의 반응액을 최종 농도에 맞춰 만든다.

| | 첨가량 | 최종농도 |
|---------------------------------|-------------|-----------------|
| 10× Taq buffer | ___ μ l | 1× |
| MgCl ₂ (25 mM stock) | ___ μ l | 1.5 mM |
| Vector(___ μ g) | ___ μ l | 50 ng/ μ l |
| dTTP(100 mM stock) | ___ μ l | 2 mM |
| Taq polymerase(5 U/ μ l) | ___ μ l | 5 U/100 μ l |
| ddH ₂ O | ___ μ l | |
| total | ___ μ l | |

④ 반응액이 증발하지 않도록 mineral oil을 넣는다.*5

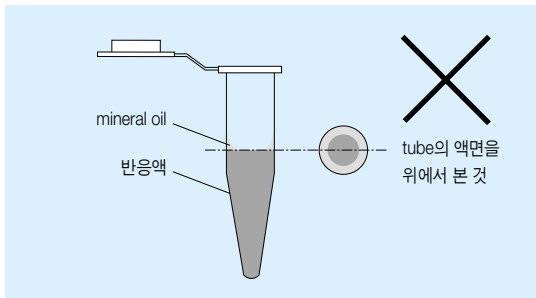


그림 8

⑤ 70℃에서 2시간 incubation한다.

(___ : ___ ~ ___ : ___)

⑥ Mineral oil층 아래 반응액의 전부를 새로운 1.5 ml microtube로 옮긴다.*6

⑦ 동량의 PCI를 넣어 vortex로 혼합한다.

⑧ 15,000 rpm으로 5분간 원심분리한다.

(___ : ___ ~ ___ : ___)

⑨ 수층(상층)을 새로운 micro tube에 옮긴다.

⑩ Step ⑦~⑨를 반복한다.

⑪ 아래의 시약을 넣는다(isopropyl alcohol 침전)*7

3 M Sodium acetate 0.1 vol (___ μ l)

Isopropyl alcohol 1 vol (___ μ l)

⑫ Vortex Mixer로 잘 혼합한 후 실온에 10분간 둔다.

(___ : ___ ~ ___ : ___)

⑬ 15,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 핵산을 침전한다.

(___ : ___ ~ ___ : ___)

⑭ 상층액을 micropipetting 또는 aspiration으로 제거한다.

⑮ 70% 에탄올을 0.5 ~ 1 ml 넣고 vortex로 가볍게 혼합한다.

⑯ 15,000 rpm, 4℃에서 2분간 원심분리하여 핵산을 침전한다.

(___ : ___ ~ ___ : ___)

⑰ 상층액을 micropipetting 또는 aspiration으로 제거한다*8.

⑱ Microtube를 paper towel 위에 거꾸로 세워 수분을 완전히 제거한다.

⑲ 원심 건조기로 pellet를 완전히 건조한다.

⑳ 50 ng/ μ l 정도의 농도가 되도록 TE buffer에 용해한다.

㉑ 10~수십 μ l씩 분주하고*9, -20℃에서 보존한다.

*1 사용하는 제한효소의 종류에 따라 완성한 vector의 유입 효율이 다르다. pBluescript의 경우, EcoR V 쪽이 Hinc II 보다 효율이 좋다.

*2 10 μ g 정도 잘라 많이 만들어 두면 편리하다.

*3 step ②는 생략할 수도 있지만 최소한 시료의 일부를 전기 영동하여 완전절단을 확인해 둘 것.

*4 용기는 incubator 형태에 맞춘다. Thermal Cycler등의 PCR 장치를 이용하면 간단하므로 0.2 ml microtube로 만들면 좋다. 또 급격한 온도 변화가 일어나는 것은 아니므로 PCR과 달리 수백 μ l를 하나의 tube에 넣어도 좋다.

*5 액량이 많은 경우에는 통상의 PCR처럼 mineral oil을 1방울 떨어뜨려서는 액면을 덮을 수 없으므로 주의해야 한다. Mineral oil이 적으면 오일 소수성의 polypropylene tube 벽에 흡착하고 액면의 중심이 노출된다(왼쪽 그림 8 참조).

*6 가열한 tube의 덮개는 느슨하게 되어 phenol chloroform을 처리할 때 액체가 새 수도 있고, mineral oil도 제거해야 하므로 새로운 tube로 옮긴다. 또 다소 혼합된 mineral oil은 다음 step에서 제거할 수 있으므로 신경쓰지 말고 반응액을 가능한 한 완전하게 회수하도록 한다.

*7 고농도의 dTTP가 함유되어 있기 때문에 ethanol 침전보다는 isopropylalcohol 침전 쪽이 dTTP의 공침을 예방할 수 있으므로 좋다.

*8 70%의 ethanol로 rinse한 후에는 DNA pellet이 떨어지기 쉬우므로 주의할 것.

*9 T vector는 보존성이 그다지 좋지 않으므로 동결 용해를 피하기 위해서 분주해두는 것이 좋다(4. TA cloning법의 주의사항 (2) 참조).

2. T Vector용의 Insert 조제

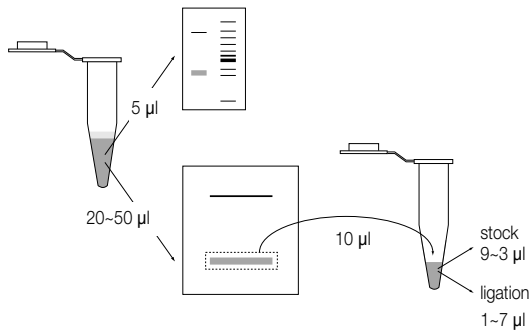
(1) 방법

① Mineral oil층 아래의 PCR 반응액으로부터 5 μ l을 취하여 mini gel로 전기영동하여 목적 단편의 증폭여부를 확인한다*1.

② PCR 후, 시료 20~50 μ l*2를 agarose gel*3에 전기

영동하여 목적 band를 잘라낸다*⁴.

- ③ Gel에서 잘라낸 DNA를 정제하여 ethanol로 침전한다*⁵.
 ④ 10 μ l의 TE buffer또는 ddH₂O*⁶에 용해하여 DNA 시료로 하고, 이 중의 1~7 μ l*⁷을 ligation에 이용한다.



- *1 증폭되는 것이 확실한 시료이면 step ①을 생략해도 좋다.
 *2 10 μ l의 반응액에서 시작하여도 cloning은 가능하다.
 *3 GTG grade의 agarose를 사용하는 것이 좋다.
 *4 PCR 산물을 직접 Phenol/Chloroform 처리, ethanol 침전한 경우에는 primer dimer 등의 저분자 물질이 혼입하여 cloning 되기 쉬우므로 gel에서 정제하는 것이 좋다. 전기영동에서 main band밖에 보이지 않는 경우라도 저분자의 band는 EtBr의 염색 효율이 나빠 보이지 않을 수도 있다.
 *5 단 PCR 산물과 같은 수백 bp의 짧은 단편의 정제에 이용하는 low melting agarose(NuSieve GTG agarose 등)은 수층이 섞이기 쉬우므로 phenol처리를 여러 번 한 후에 PCI처리를 하는 것이 좋다.
 *6 다음 단계에서 다량으로 ligation에 이용하는 경우는 ddH₂O로 녹인다. 통상은 TE buffer에 용해하고 극히 일부를 ligation하고 남은 것은 보관해 둔다(위의 그림 참조).
 *7 수~십수 μ l의 PCR 용액에 상당한다.

3. Ligation

(1) 방법

- ① Microtube에 아래의 시약을 순서에 따라 넣어, ligation 반응액을 조제한다.

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| □ 10× Ligation Buffer* ¹ | 1 μ l |
| □ ddH ₂ O | _____ μ l |
| □ Vector | 1 μ l |
| □ 제한효소로 절단하고 정제한 PCR 단편 | 1~2 μ l |
| □ T4 DNA ligase | 1 μ l |
| total | 10 μ l |

- ② 16℃에서 30분~1시간 정도*² 반응한다.
 ③ Competent cell에 transformation한다.

*1 ATP를 함유하고 있는 ligation buffer를 예로 보여주고 있다. Buffer에 ATP를 함유하지 않는 경우는 필요한 양만큼의 ATP를 첨가 해주어야 한다.

*2 Ligase의 maker나 competent cell의 condition에 따라 시간이 다를 수 있다.

4. TA Cloning 법의 주의사항

- (1) T Vector를 이용하여 실험하는 경우 반드시 ① ligation 하지 않은 vector 시료와 ② vector를 self ligation한 시료 2개를 control로서 동시에 transformation하여 vector의 “성능”을 확인해야 한다. ②의 colony가 많은 경우는 말단에 T의 부가가 안된 상태로 이 경우는 vector를 다시 ethanol 침전하여 1. T Vector 조제의 T 부가반응을 다시 하는 것이 좋다.
 (2) T vector는 보존성이 좋지 않아, 동결융해를 반복할 경우 insert를 함유하지 않은 self ligation의 비율이 증가할 수도 있다. 그 이유는 보존 중에 서서히 말단의 T가 떨어져 나오기 때문이라고 생각된다. 이 경우에는 vector를 재조제해야 한다. T vector의 조제과정에서 제한효소에 의한 완전절단과 linear strand DNA의 정제 단계가 중요한 것이므로 T의 재부가 반응에 의한 vector의 “재생”은 시간을 절약해 준다.
 (3) TA cloning의 원리에서 보면 insert의 방향은 완전히 random하게 되므로 실험에서 얻을 수 있는 subclone을 다수의 sequence로 볼 때 PCR 단편이 들어가기 쉬운 방향이 결정되어 있는 경우가 많다. 그 방향이 자신이 찾는 방향과 반대의 방향일 경우가 많아 screening이 필요하다.
 (4) PCR 산물의 방향을 결정하여 vector에 도입하고자 하는 경우에는 2.(2) 제한효소 인식서열의 부가에서 설명한대로 primer에 제한효소 인식서열을 포함하는 adaptor를 도입하면 쉽고 빠르게 insert의 방향을 screening할 수 있다.

5. 일반적인 Subcloning의 응용

PCR 산물을 subcloning할 경우 적절한 제한효소 인식부위가 없으므로 말단의 평활화와 blunt end ligation을 해야만 하는 경우가 자주 있다. 이런 경우 문제가 되는 것은 blunt end ligation의 효율이 나쁘다는 것이다. 여기서 소개한 T vector계는 blunt ligation보다 효율이 좋은 방법으로 전부 blunt end ligation에 응용할 수 있다. Blunt end는 제한효소로 절단한 DNA나 T4 DNA polymerase로 평활화한 DNA단편을 1. T Vector의 조제에서 서술한

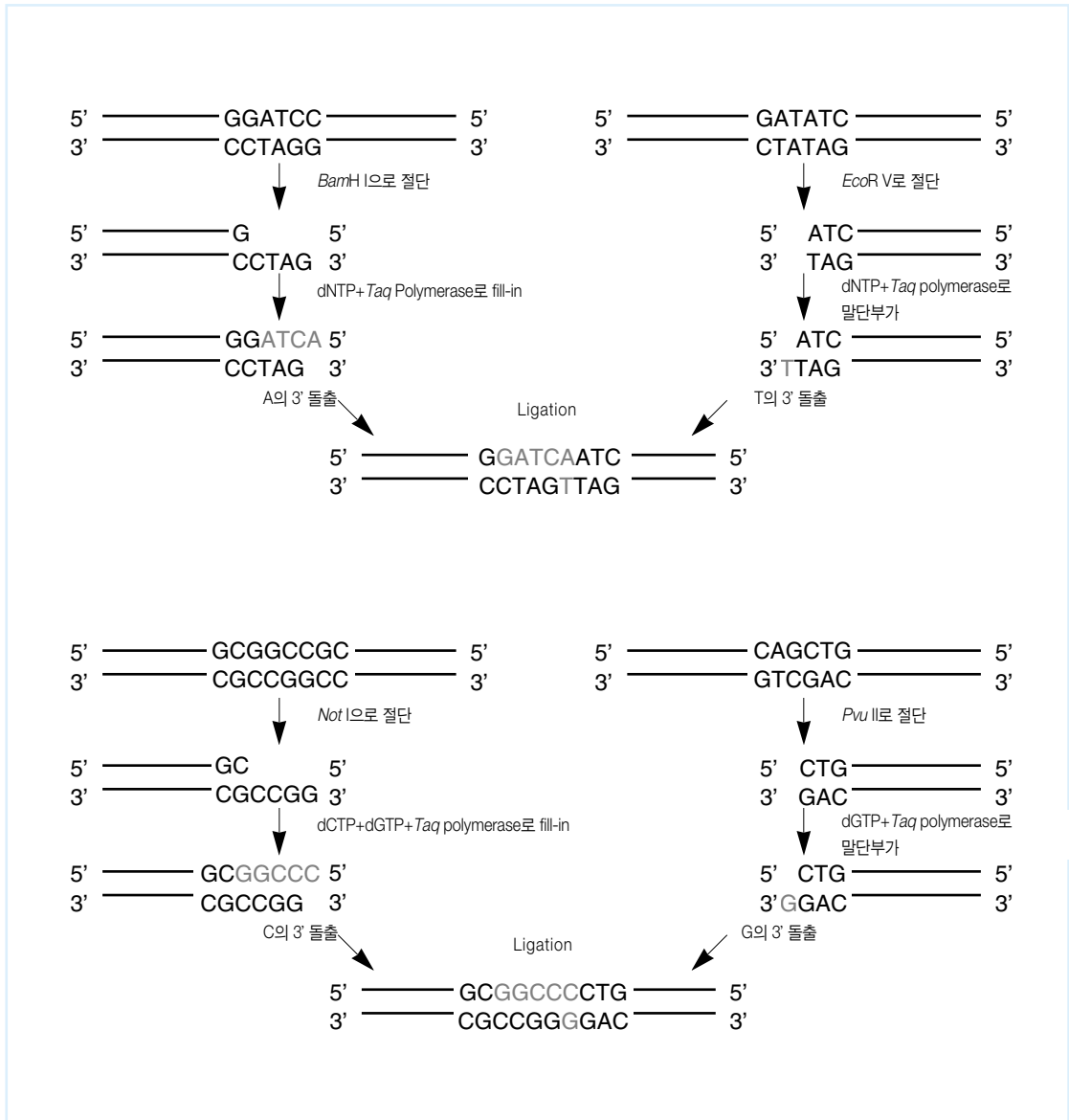


그림 9

방법으로 incubation하면 T의 3' 돌출이 되고 dTTP의 자리에 dATP를 부가하여 incubation하면 A가 돌출되므로 쉽게 ligation을 할 수 있다.

또한 5' 말단이 돌출한 경우는 T4 DNA polymerase의 대신에 Taq polymerase를 이용하여 말단을 fill-in 하면 자동적으로 A의 3' 돌출말단이 생성된다. 이러한 방법으로 5' 돌출말단을 blunt end로 만드는 방법을 기억하면 도움이 될 것이다.

또한 다른 방법으로서 Taq polymerase의 TdT 활성이 DNA 말단의 염기에 따라 좌우됨을 이용하여 TA염기 뿐 아니라 CG 염기를 이용하여 ligation할 수도 있다. 그림 9에 그 일례를 나타내었다.

PCR을 이용한 DNA, RNA 해석 기술의 원리

PCR의 원리는 2가닥의 DNA를 주형으로 하여 특정영역을 사이에 두는 두개의 primer가닥을 DNA polymerase에 의해 신장을 반복함으로써 primer 사이의 DNA 단편을 증폭하는 것은 주지의 사실이다.

이 PCR을 기반으로 여러가지 DNA, RNA의 해석 기술이 고안되어 있다. 각각 중요한 아이디어가 들어 있으므로 이러한 기술 중 최근에 비교적 자주 사용되는 몇몇의 방법에 대하여 그 원리를 간단히 정리하여 소개하고자 한다.

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)이 처음으로 소개된 것은 1986년이다. Cold Spring Harbor 연구소에서 개최된 Symposium on Quantitative Biology "The Molecular Biology of Homo Sapiens"에 참석한 Kary Mullis가 PCR의 개발을 보고한 것이다¹⁾. 이 발표는 분자생물학, 의학 등의 폭넓은 분야에서 DNA를 cloning할 필요없이 아주 소량의 DNA만 있으면 target 유전자의 상태를 알 수 있게 해 주는 혁명적인 것이라 할 수 있다.

1953년 Watson과 Crick에 의해 DNA 나선 구조의 해명으로 시작된 DNA 분자생물학의 세계는 20년 후 제한효소의 발견과 그에 따른 DNA cloning법, 염기서열 결정법의 개발로 혁명적인 변혁을 맞게 되고, 그리고 10년 후 PCR의 탄생은 새로운 혁명을 맞게 된다. 이 PCR 기술의 개발로 Mullis는 1993년도 일본 국제상을 수상하게 되고, 이듬해 노벨 의학 생리학상으로 빛나게 된다.

두 가닥의 DNA를 주형으로 하여 특정영역을 사이에 두고 짧은 primer DNA를 각 상보가닥에 hybridize 하여 기질이 되는 4종류의 deoxy nucleotide triphosphate(dNTP)의 존재하에서 DNA polymerase를 작용시키면 이 primer의 3' 말단에 주형의 염기서열에 따라서 nucleotide가 첨가되어 가닥이 신장한다. PCR의 원리는 이 반응으로 형성된 새로운 두가닥 DNA를 가열하여 상보가닥으로부터 분리하고 과잉으로 존재하는 primer를 해당 위치에 결합시켜 DNA polymerase로 새로운 DNA 가닥을 합성하는 것이다. 이 반응을 반복하므로써 목적 영역을 함유하는 DNA 단편을 대량으로 얻을 수 있다. 이 원리로 DNA 단편의 수를 늘릴 수 있다는 것은 1976년 tRNA 유전자를 대상으로 처음으로 기능을 갖는 유전자의 인공합성에 성공한 H. G. Khorana가 위스콘신대학에서 MIT로 옮겼을 즈음인 1971년에 발표한 논문 가운데 이미 서술되었다²⁾. 그러나 그 당시 배경이 되는 과학적 지식, 기술의 진보가 충분하지 않았던 것도 영향을 미쳤을지 모르나 실용화까지 진행되지 않아 PCR이 되지는 못하였다.

그로부터 10년, Mullis에 의해 PCR이 화려하게 탄생한 것이다. 반응으로부터 얻은 두가닥 DNA를 가열하여 상보가닥을 분리하는 과정에서 DNA polymerase가 실패하기 때문에 반응을 반복할 때마다 새로운 효소를 첨가하여야 하는 불편함은 내열성 DNA polymerase를 사용하는 등의 연구가 계속되고 기계화되어 지금은 각 연구실마다 한 두 대씩 보유하는 시대가 되었다.

과학기술 특히 분자생물학, 생화학분야의 기술에 있어서는 단순한 원리, 간단한 조작일수록 유용성이 많은 경향이 있다. 즉 초심자가 논문에 따라서 실험을 진행하여도 반드시 제대로 된 결과를 얻을 수 있는 기술이다. PCR은 그 전형적인 예이다. PCR의 원리는 위에서 설명한 바와 같으나 이 PCR을 기반으로 하여 DNA, RNA 해석기술이 고안되었고 이는 약어로 불려지고 있으므로 그 원리를 알지 못하는 경우가 많다. 각각의 기술은 기발한 아이디어로 개발되어 있어 그 원리들을 간단히 정리하여 본다.

단 Alu PCR, inverse PCR, asymmetric PCR, multiplex PCR, RT-PCR, PCR에 의한 변이도입, 또 Allele 특이적 PCR, GC clamp PCR, PCR-SSCP 등 DNA 염기서열의 변화를 검출하는 기술은 이미 널리 알려져 있으므로 생략한다.

1. PCR

내열성 DNA polymerase가 PCR의 주역이므로 대표적인 효소의 기본적인 성질을 정리하였다. PCR에 통상 사용하는 내열성 DNA polymerase는 *Thermus aquaticus*에서 정제한 Taq DNA polymerase이다. 이것은 2.5 kb의 유전자가 code하는 832 개의 아미노산으로 구성되어 있으며 5' → 3' exonuclease 활성을 갖고 있으나 3' → 5' exonuclease 활성은 갖고 있지 않다. *AmpliTaq*, *TaKaRa Taq*은 clone화한 Taq DNA polymerase를 대장균에서 발현하여 정제한 효소이다³⁾. 내열성 DNA polymerase 중 중요한 것들을 표 1에 정리하였다. Stoffel fragment는 효소로서의 안정성이 Taq의 2배이므로 PCR의 변성과정에서 보다 높은 온도로 사용할 수 있으므로 GC rich 영역, 복잡한 2차구조를 갖는 영역의 증폭에 유리하다. *Vent* DNA polymerase는 *Thermococcus litoralis* 유래로서 높은 열안정성을 가지며, 긴 단편을 합성할 수 있다. 3' → 5' exonuclease 활성으로 말미암아 primer의 3' 말단에 잘못 삽입된 염기를 제거할 수 있어 mismatch가 적은 DNA를 합성할 수 있다. 그러나 이같은 특성으로 인하여 allele 특이적 PCR에는 사용할 수 없다. Stoffel fragment, *Vent* DNA polymerase는 열안정성이 뛰어나 고온에서의 반응이 가능하므로 주형 DNA의 복잡한 고차구조의 형성을 저해하여 DNA sequencing 반응용 효소로서 유리하다. *Pfu* DNA polymerase는 *Pyrococcus furiosus*에서 분리한 효소로 3' → 5' exonuclease 활성을 갖고 있으므로 DNA 단편의 증폭에 있어서 잘못된 염기를

| DNA polymerase | 분자량 (K) | 최적온도 (°C) | 신장속도 nucleotide/sec | 안정성(반감기, min) | | | exonuclease 활성 | | mismatch 빈도 (1 bp/kbp) | 증폭DNA 길이 (kbp) |
|----------------|---------|-----------|---------------------|---------------|--------|--------|----------------|---------|------------------------|----------------|
| | | | | 97.5°C | 95.0°C | 92.5°C | 5' → 3' | 3' → 5' | | |
| <i>Taq</i> | 94 | 75~80 | 150 | 10 | 40 | 130 | + | - | 5~15 | <5~6 |
| <i>Stoffel</i> | 61 | | >50 | 20 | 90 | ? | - | - | | <0.3 |
| <i>Vent</i> | ? | | >80 | 130 | 360 | ? | - | + | 20 | 10~13 |
| <i>Pfu</i> | 92 | 72~78 | 60 | >180 | >120 | ? | ? | + | 140 | <1.5~2 |
| <i>rTth</i> | | | 150 | | | | + | - | | <5~6 |

표 1 내열성 DNA polymerase

삽입하는 비율이 *Taq* DNA polymerase에 비하여 12분의 1 정도이다. PCR로 얻는 DNA 단편은 사용하는 효소의 염기삽입 정확도에 의존하여 잘못된 염기를 함유하는 분자가 존재한다. 따라서 그 염기서열의 결정은 clone화한 분자를 재료로 하는 경우 잘못된 염기를 읽는 경우가 생긴다. 따라서 반응산물을 혼합물의 상태로 직접 해석 재료로 사용하든지, clone화한 경우에는 복수의 clone에서 동일한 결과인지를 확인한다. 또는 복수의 clone을 혼합하여 해석 재료로 사용할 필요가 있다.

2. Long PCR(Long and Accurate PCR)

내열성 DNA polymerase로 증폭되는 DNA 영역은 그 종류에 따라 다양하나 일반적으로 5 kb를 넘지 않고 실제로는 1~2 kb의 DNA를 얻기도 어려운 경우도 있다. 그 원인으로는 내열성 DNA polymerase에 의한 primer 가닥의 신장중에 일어나는 3' 말단의 A잔기의 부가로 생기는 mismatch의 형성, PCR 과정 중 고온처리 과정에서 일어나는 DNA상의 purine염기의 유리(depuration), 3' → 5' exonuclease 활성을 갖는 효소의 경우 primer 3' 말단의 제거 등에 의한 DNA 가닥의 신장의 정지 등을 들 수 있다.

PCR로 10~20 kb의 DNA 단편을 증폭할 수 있으면 cDNA 염기서열로부터 genome DNA의 intron 염기서열을 알 수가 있어, 상동 재조합에 사용하는 DNA 단편을 간단히 얻을 수 있는 등 다양하게 응용할 수 있다.

이와 같은 요구에 부응하는 하나의 방법으로서 그림 1에 나타낸 바와 같이 3' → 5' exonuclease 활성을 갖는 효소를 이용하는 것이다. Mismatch 염기를 primer 말단으로부터 제거하므로써 계속해서 PCR에 의해 primer의 신장이 일어난다. 3' → 5' exonuclease 활성을 갖지 않는 일반

*Taq*에 5' → 3' exonuclease 활성을 부여하고, 3' → 5' exonuclease 활성을 갖는 *Pfu* polymerase를 미량 공존시키므로써 긴 증폭단편을 얻을 수 있다^{4,5)}.

3. Hot start PCR

PCR을 시작할 때 온도가 T_m 값 이하로 떨어지면 primer dimer 형성이나 비특이적 start가 일어나게 된다. Hot start는 이 같은 난점을 극복하기 위한 것이다. 그 원리는 첫 번째 변성온도에 이르기까지 예를 들면 DNA polymerase 등 공통 반응성분의 하나를 반응계로부터 첨가하지 않는 것이다. 이 원리를 실제로 사용하는 경우로서 아래의 3가지 방법을 들 수 있다. ① mineral oil을 넣는 반응계로 반응하는 tube수가 많지 않은 경우, 최초의 변성

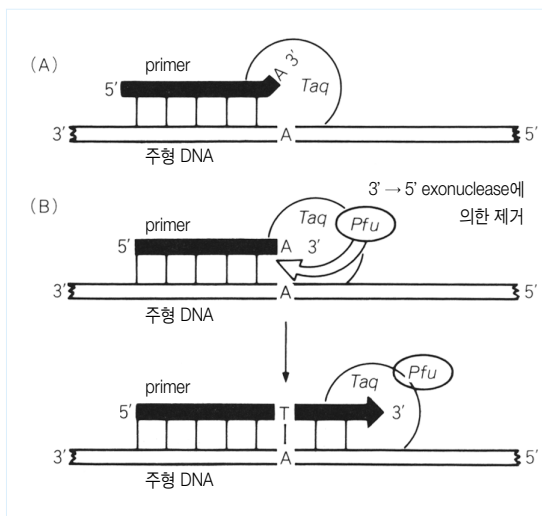


그림 1 long PCR

(A) *Taq* DNA polymerase에 의한 PCR, (B) *Taq* DNA polymerase에 3' → 5' exonuclease를 갖는 polymerase를 공존시키는 long PCR

온도에 이른 다음에 각 tube에 공통반응 구성성분을 첨가한다. ② wax beads를 반응액 위에 놓고 가열 용해 후 고형화하여 층을 만든다. 그 위에 첨가하지 않았던 공통 반응 구성성분을 첨가한다. 첫번째 변성온도로 가열할 때 wax가 용해하여 고온시에 전 구성성분이 만날 수 있도록 한다. ③ 반응 구성성분을 처음부터 혼합하나 항 *Taq* DNA polymerase 항체를 반응액에 첨가하여 놓는다. 변성온도에 달하는 과정에서 이 항체가 polymerase로부터 유리하여 실험하게 되므로 고온에서 전 구성성분이 갖추어 지게 된다.

4. Rapid Amplification of cDNA Ends(RACE)

cDNA의 일부만의 염기서열을 알고 있는 경우 그 5' 그리고 3' -말단부분을 단리하는 PCR이다⁶⁾. Anchored primer⁷⁾ one-sided PCR⁸⁾도 같은 목적이나 원리로 하는 방법이다.

RACE의 원리는 그림 2와 같다. cDNA의 3' 말단의 증폭에는 우선 3종류의 제한효소 인식서열을 갖는 35 nucleotide(18 nucleotide의 Q_0 , 18 nucleotide의 Q_2 로 구성되어 Q_0 의 3' 말단과 Q_1 의 5' 말단이 같은 염기서열을 공유한다)에 계속하여 T가 17개 연결된 Q_T primer를 사용하여 mRNA를 주형으로 역전사반응하여 한가닥 cDNA를 합성한다. 이 cDNA를 주형으로 Q_T primer의 5' 말단에 위치하는 Q_0 서열을 primer로 하여 미리 알고 있었던 mRNA 5' 말단에 보다 가까운 영역에 대응하는 유전자 특이적 primer-1(GSP1)의 사이에 PCR을 실시한다. 계속해서 이 PCR산물을 주형으로 GSP1보다 안쪽의 GSP2 primer와 Q_1 primer를 사용하여 nested PCR을 실시하므로써 기지영역에서 poly(A) 까지의 3' 말단측의 cDNA를 얻을 수 있다(그림 2A). 5' 말단영역의 cDNA에 관해서는 mRNA를 주형으로 역전사용 유전자 특이적 primer(GST-RT)를 사용하여 한가닥 cDNA를 제작하고 계속해서 그 3' 말단에 terminal deoxynucleotidyl transferase로 A잔기를 부가한다. 이 poly(A) 부분에 GT primer를 annealing시켜 GSP1 primer 사이로 PCR을 실시한다. Q_T primer와 보다 안쪽의 유전자 특이적 GSP2 primer를 사용하여 nested PCR로 cDNA의 5' 말단 영역을 얻을 수 있다(그림 2B).

그림 2에 나타낸 RACE에서는 5' 말단 영역은 얻은 DNA의 단편이 반드시 mRNA의 5' 말단까지 포함되어 있다고는 말할 수 없다. 이와 같은 문제를 해결하는 방법으로서

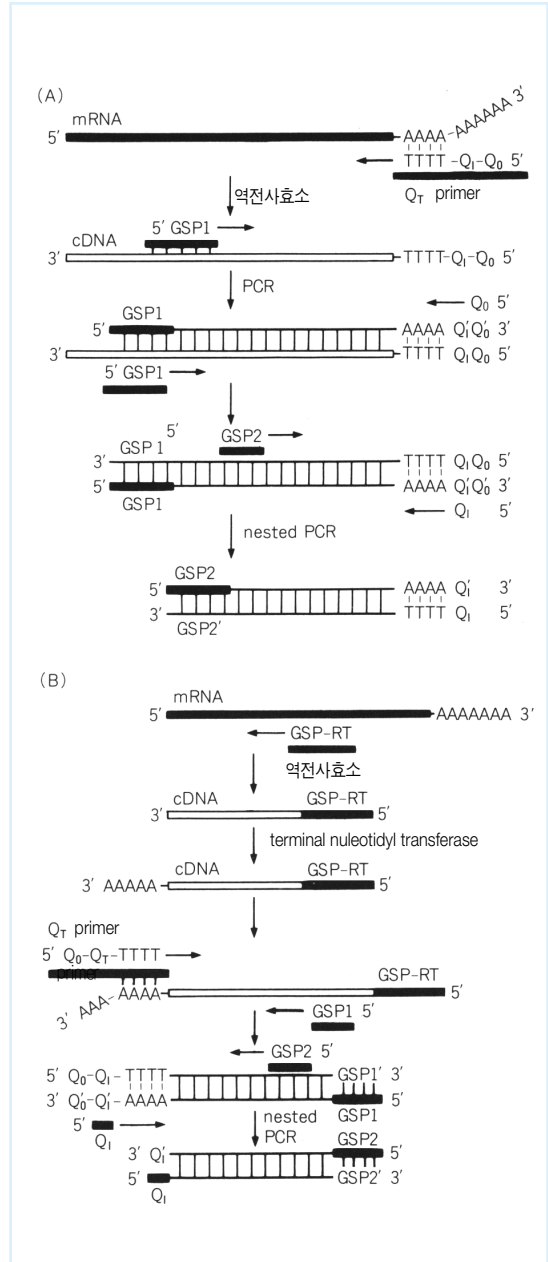


그림 2 RACE법에 의한 cDNA 양말단의 증폭

(A) cDNA 3' 말단의 증폭

(B) cDNA 5' 말단의 증폭 Q_T primer는 18 nucleotide의 Q_0 , 18 nucleotide의 Q_1 (Q_0 의 3' 말단과 Q_1 의 5' 말단의 nucleotide는 공통)로 구성된 35 nucleotide의 Q_0 - Q_1 서열의 3' 말단에 17개의 T가 연결된 oligonucleotide. 이 35 nucleotide 서열중에 *Hind* III, *Pst* I, *Xho* I의 인식서열이 들어 있다. GSP1, GSP2는 cDNA의 염기서열의 기지영역에 대응하는 유전자 특이적 primer. GSP1', GSP2'는 cDNA의 기지의 염기서열 영역에 대응하는 유전자 특이적 primer. GST-RT는 역전사 반응의 유전자 특이적 primer

그림 3에 나타난 신 RACE법이 고안되었다⁹⁾. 이 방법의 요점은 cDNA를 제작하는데 있어서 cap을 갖고 있는 full length mRNA를 선택하는 것과 mRNA의 5' 말단에 직접 염기서열을 알고 있는 RNA를 anchor로서 첨가하는 것이다. 우선 mRNA의 5' 말단을 탈인산화한다. full length mRNA는 5' 말단에 cap구조를 갖고 있으므로 탈인산화 반응의 영향을 받지 않으나, cap 구조를 갖고 있지 않은 5' 말단이 결손된 분자는 그 5' 말단의 인산기가 제거된다. 계속해서 cap구조를 제거하는 반응을 실시하면 full length mRNA는 5' 말단에 인산기를 갖는 형태가 된다. 이 5' 말단에 이미 알고 있는 짧은 RNA를 T4 RNA ligase로 결합한다. Anchor를 첨가한 mRNA를 주형으로 GST-RT primer를 사용한 역전사효소 반응으로 한가닥 cDNA를 제작한 다음 첨가한 anchor RNA의 염기서열에 대응하는 NRC1 primer와 GSP1 primer를 사용하여 PCR을 실시

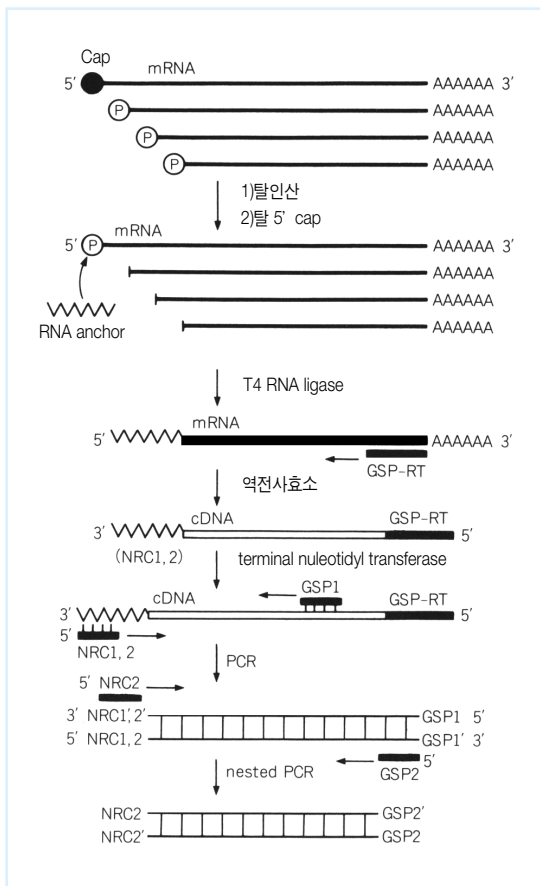


그림 3 신 RACE

NRC1, 2는 mRNA의 5' 말단에 결합한 RNA 부분에 특이적인 primer, GSP1, 2는 유전자 특이적 primer

한다. 얻어진 DNA 단편을 주형으로 NCR2와 GSP2 primer에 의해 nested PCR을 실시하므로써 full length mRNA의 5' 말단 영역을 갖는 cDNA를 얻을 수 있다.

5. Nested PCR

Nested PCR, seminested PCR의 원리는 그림 4와 같다. 목적하는 영역의 처음의 PCR산물을 주형으로 처음에 사용한 primer의 위치보다 양쪽 모두 안쪽으로 primer의 위치를 설정하여 PCR을 실시하는 것이 nested PCR이고, 어느쪽이든 한쪽의 primer만을 안쪽의 것으로 사용하는 것이 seminested PCR이다. 이 같은 조작으로 목적 이외의 영역으로부터 유래하는 산물을 제거할 수 있다.

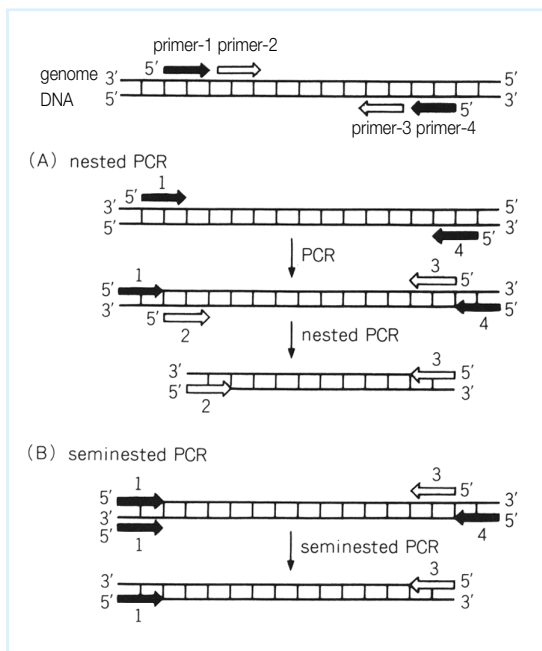


그림 4 Nested PCR, Seminested PCR

6. Arbitrarily Primed-PCR(AP-PCR)

AP-PCR은 한개의 primer를 사용하는 PCR로 그 원리는 그림 5와 같다. 처음 수회의 cycle은 조건이 약한 상태(예를 들면 annealing 온도 50℃ 등)로 실시하여 primer와 template DNA strand간에 mismatch를 갖는 hybrid를 형성하여 primer를 신장시킨다. 계속해서 통상의 annealing 온도조건으로 PCR을 실시하므로써 약한 조건에서 생성된 DNA 단편을 증폭한다. 이 같은 PCR로 평균 약 30개의 다양한 염색체 유래의 단편이 증폭된다¹⁰⁾. 통상

의 PCR을 25 cycles 정도에서 정지하면 준정량적으로 최초의 약한조건에서 생성한 산물의 양을 반영한 DNA 단편을 얻을 수 있다.

Polyacrylamide gel 전기영동으로 분획하여 얻은 finger print를 비교하므로써 염색체 영역의 copy수의 증감 등을 검색할 수 있다. 또 signal의 유무로 DNA상의 염기서열의 다형을 검출할 수 있다. AP-PCR의 산물을 한가닥으로 변성한 후 비변성 polyacrylamide gel로 분리하는 SSCP 해석을 실시하여 DNA 단편 내의 염기변화도 검출할 수 있어 DNA 염기서열상의 많은 정보를 얻을 수 있다¹¹⁾.

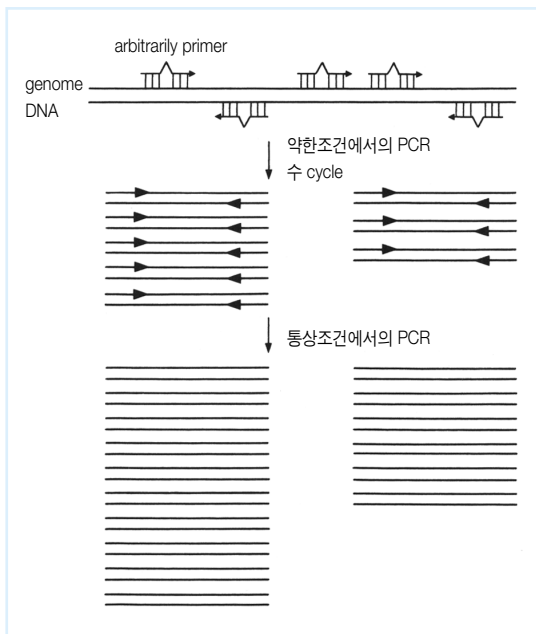


그림 5 AP-PCR

7. Differential Display RT-PCR(DDRT-PCR)

세포간, 조직간에서 다르게 발현하고 있는 유전자를 mRNA의 존재유무로 동정하는 방법으로서 1992년에 개발된 PCR을 기반으로 하는 기술이다. 이는 differential display RT-PCR(DDRT-PCR)¹²⁾ 또는 RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)¹³⁾이라 불려지고 있다.

DDRT-PCR의 원리를 그림 6(A)에 나타내었다. 요점은 degenerate anchor primer($(T)_{10}MN_1$)를 사용하여 한가닥 cDNA를 제작하고 같은 anchor primer와 임의의 염기서열을 갖는 decamer($(X)_{10}$)을 primer로 하는 PCR에 의해 cDNA의 일부영역을 증폭하는 것이다. mRNA의 poly(A)에 annealing하는 oligo dT를 갖는 anchor primer를 사

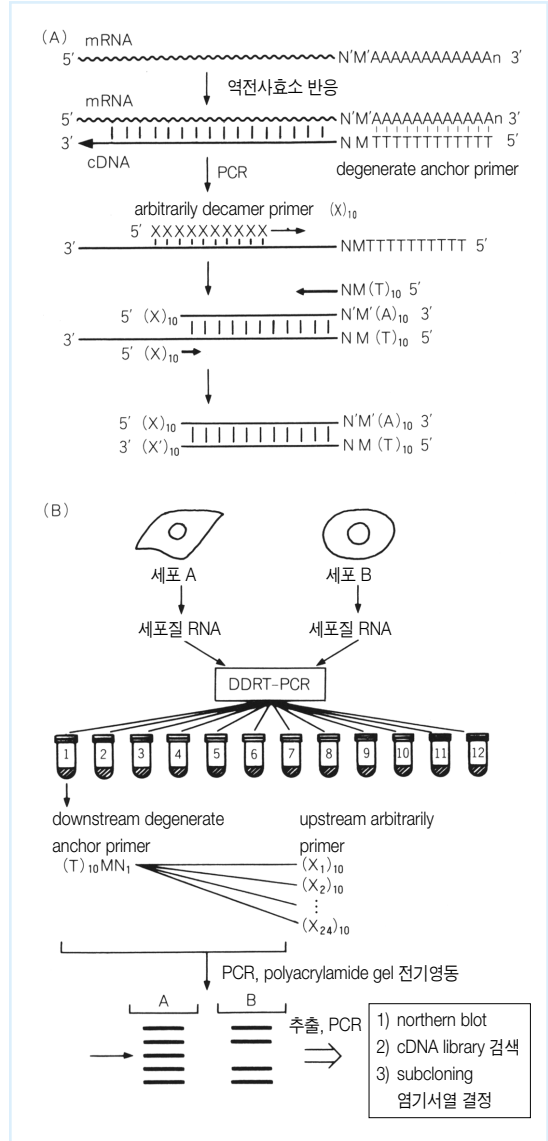


그림 6 DDRT-PCR

(A) DDRT-PCR의 원리. Degenerate anchor primer($(T)_{10}$)은 T잔기 10개의 3' 말단에 2염기 M, N를 첨가한 oligonucleotide로 M은 A, G, C 중 어느 하나, N은 A, G, T, C 중 어느 한 염기를 함유한다. 따라서 12개의 primer를 사용한다. arbitrarily decamer primer($(X)_{10}$)은 임의의 염기서열을 갖는 10 nucleotide의 oligomer를 사용한다. (B) DDRT-PCR에 의한 해석

용하나 그 3' 말단에 degenerate sequence M과 N을 부가한다. M은 A, G, C 중의 어느 염기, N은 A, G, T, C 중의 어느 염기를 나타낸다. 따라서 12종류의 primer를 사용하는 것이 되나 degenerate primer로 모든 poly(A)를 갖는 mRNA로 부터 역전사반응으로 한가닥 cDNA를 만들게 된다. 이 cDNA를 주형으로 각 degenerate

primer를 downstream의 primer로 하여, upstream의 primer로는 arbitrarily hybrid를 형성하여 primer로서 역할을 하는 임의의 염기서열을 갖는 10 nucleotide의 oligomer(X)₁₀을 사용하여 PCR을 실시한다. 이 arbitrarily primer로서 모든 염기서열을 사용할 수 있는 것은 아니고 기본적으로는 서로 hybrid를 형성하는 서열이 없으며 GC서열의 수가 5개인 것을 사용한다. 아무튼 24종류의 arbitrarily primer를 사용하여 가능한한 모든 cDNA를 증폭할 수 있도록 한다. 12종류의 degenerate primer의 각각에 대하여 24종류의 arbitrarily primer를 사용한 PCR을 2종류의 mRNA에 대하여 실시하므로 $12 \times 24 \times 2 = 576$ 반응을 실시하는 것이 된다. 96well의 plate 6장을 사용하므로서 모든 반응을 실시할 수 있다. 그림 6에 나타낸 바와 같이 다른 발현을 나타내는 mRNA를 arbitrarily primed PCR 산물을 polyacrylamide gel 전기영동으로 비교하므로서 검출할 수 있다. 대응하는 band위치에 들어있는 DNA 단편을 gel에서 용출하여 PCR로 증폭하므로서 해당하는 염기서열의 결정이나 이를 probe로 하여 northern blot 해석이나 cDNA library의 검색이 가능하다.

8. Panhandle PCR

이미 알고 있는 염기서열 영역과 접해 있는 미지영역을 PCR을 사용하여 분리하는 방법이 panhandle PCR이며¹⁴⁾ 그 원리는 그림 7에 나타내었다. Genome DNA를 제한효소로 절단하여 얻어진 DNA 단편의 돌출하는 5' 말단의 인산기를 alkaline phosphatase로 제거한다. 기지 염기서열 영역의 약 30염기의 서열을 갖는 oligonucleotide를 합성하고 그 5' 말단을 인산화하여 T4 DNA ligase로 탈인산화한 DNA 단편의 3' 말단에 연결한다. 반응액을 희석하여 DNA 단편의 농도를 낮추어 Taq DNA polymerase와 4종류의 dNTP를 첨가하여 가열변성으로 상보가닥으로 분리하고 다시 annealing한다. 저농도이므로 분자 내의 annealing이 일어나 미지영역의 3' 말단에 결합한 기지 염기서열의 oligonucleotide가 그 염기서열 유래의 부분과 hybrid 결합하므로서 stem loop 구조가 형성된다. 첨가한 Taq DNA polymerase의 반응으로 stem 부분의 3' 말단에 기지 염기서열을 주형으로 한 염기서열이 첨가된다. 계속하여 oligonucleotide에 사용한 염기서열을 사이에 둔 primer 1과 2를 사용하여 PCR을 실시하면 미지영역을 사이

에 두고 그 양단에 기지 염기 서열을 갖는 DNA 단편이 얻어진다. 이 주형의 보다 안쪽으로 설정한 primer 3과 4를 사용하여 nested PCR을 실시하므로서 목적으로 하는 미지영역을 얻는다.

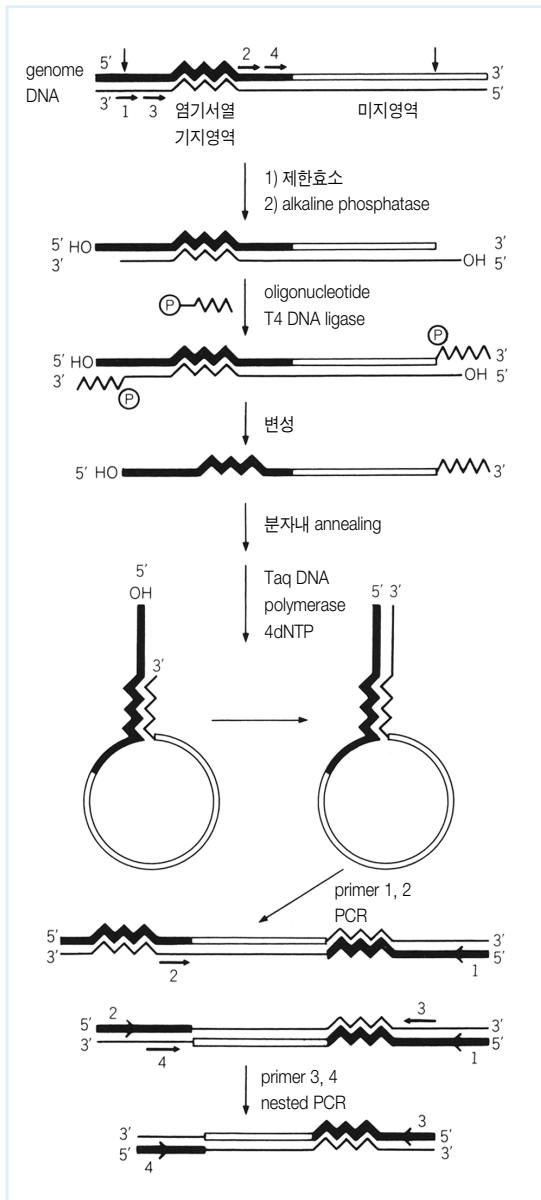


그림 7 Panhandle PCR

Genome DNA상의 이미 기지 염기서열을 굵은선으로 미지영역을 굵은 흰선으로 나타내고 상보가닥을 가는선으로 나타냈다. 짧은 화살표는 primer의 위치를 나타낸다. 파상으로 나타낸 부분은 기지의 염기서열의 oligonucleotide에 대응하는 영역을 나타낸다.

9. Single-Nucleotide Primer Extension assay (SNUPE)

다형의 염기서열을 갖는 유전자의 발현을 RT-PCR을 기본으로 비교하는 편리한 방법으로¹⁵⁾ 그 원리는 그림 8의 P_{gk}-1 유전자의 발현예로 나타내었다. RT-PCR로 얻은 cDNA를 주형으로 SNUPE용 primer와 다형에 의존하여 삽입되는 표식 nucleotide의 기질 한종류를 첨가하여 Taq DNA polymerase 존재하에서 1 cycle의 PCR을 실시한다. 1염기만이 첨가된 primer를 염기서열 결정용 gel에 전기영동하여 분리 정량한다.

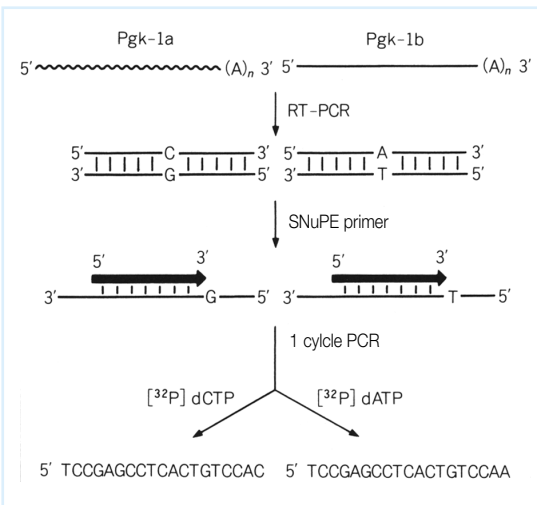
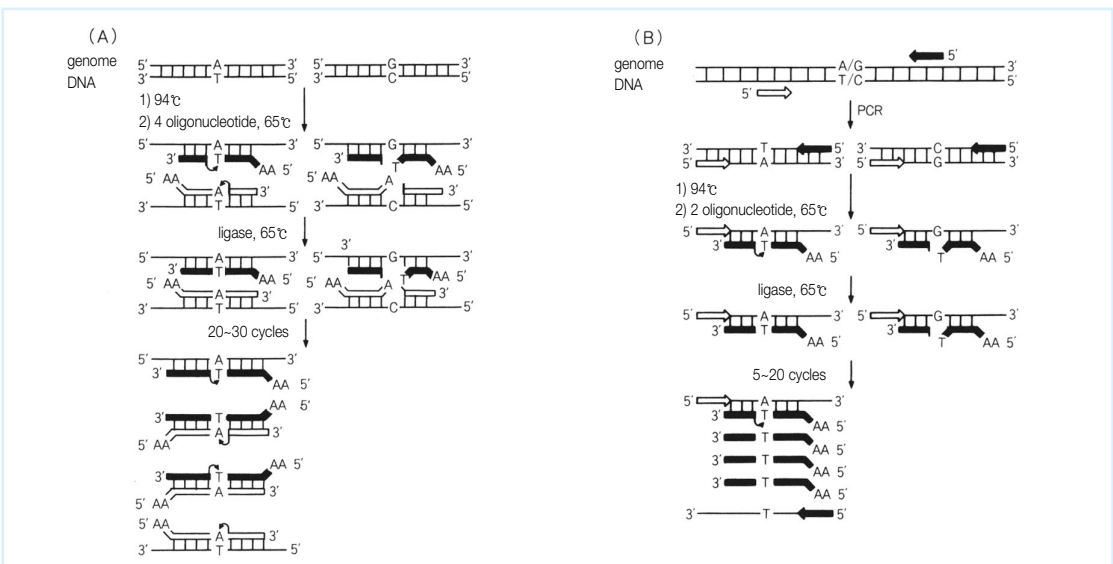


그림 8 SNUPE

10. Ligase Chain Reaction(LCR)

염기서열의 다형을 이용하여 allele를 구별하는 등에 유용한 방법으로서 내열성 ligase를 사용하는 것이 특징이며 몇가지의 변법이 있다. 기본적인 원리는 oligonucleotide 사이를 ligase로 결합할 수 있는가, 없는가로 1염기 치환을 구별하는 것이다. 그림 9(A)에 ligase chain reaction(LCR)의 원리를 나타내었다. 목적염기 영역을 포함하는 5' 쪽 oligonucleotide 2개와 3' 쪽 염기서열을 포함하는 2개의 oligonucleotide 등 모두 4개를 genome DNA에 annealing한다. Mismatch가 없는 경우는 내열성 ligase로 2개의 oligonucleotide가 결합한다. 두가닥 DNA의 열변성, ligase 반응을 수회 반복하므로서 결합한 oligonucleotide가 상보가닥 oligonucleotide 결합의 주형이 되어 결합한 oligonucleotide의 수가 증폭한다. 한편 genome DNA상에 mismatch가 존재하는 oligonucleotide는 결합한 분자를 만들지 않는다.

그림 9(B)는 변법의 하나인 ligase detection reaction(LDR)의 원리로 genome DNA를 직접 해석하는 것이 아니라 우선 PCR로 목적영역을 증폭하여 단편화하고 여기에 oligonucleotide를 결합한다. 이 반응에서 사용하는 oligonucleotide는 2개이다. PCR 산물의 한쪽 가닥만을 주형으로 하여 내열성 ligase로 두개의 oligonucleotide 사이를 결합한다. 2가닥 DNA의 변성, ligase 반응을 반복하므로서 결합한 oligonucleotide의 수가 증가한다. 이들 probe oligonucleotide 사이를 직접 결합하는 반응에서는 주형



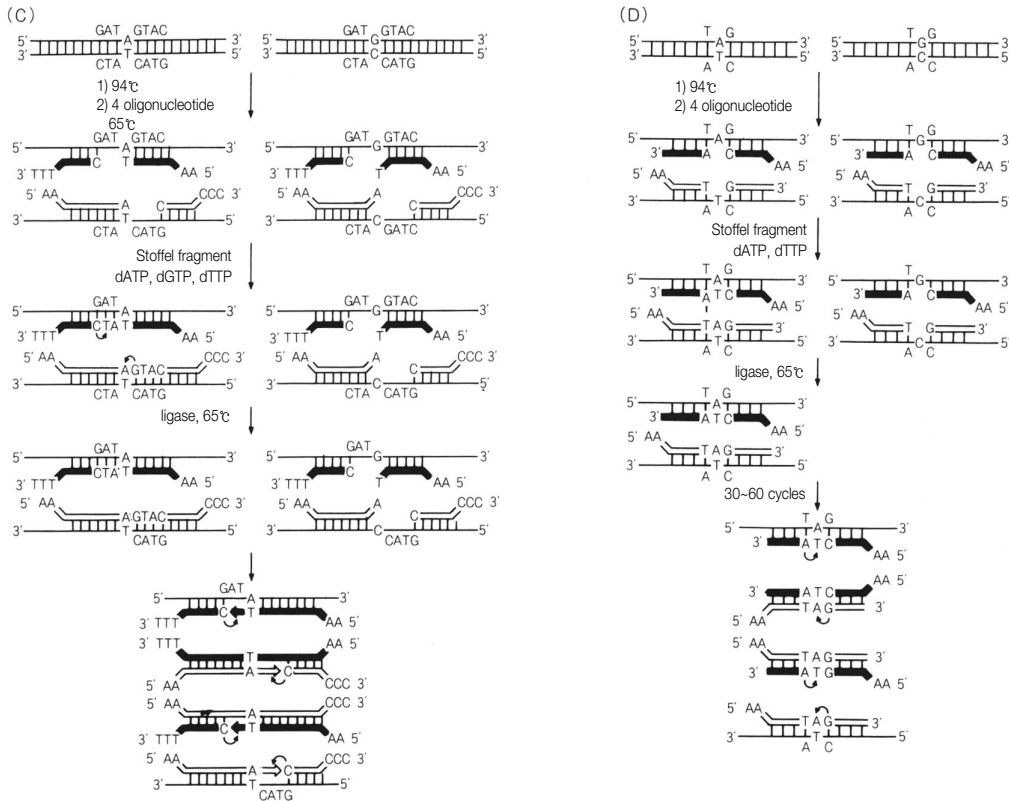


그림 9 Ligase 증폭반응(LCR)의 원리

(A) Ligase chain reaction(LCR) (B) Ligase detection reaction(LDR)

(C) pLCR, (D) gap LCR(G-LCR), oligonucleotide의 5' 말단의 AA, 3' 말단의 TTT, CCC는 각각 3' 말단, 5' 말단과의 결합을 방해하기 위하여 첨부한다.

DNA에 의존하지 않는 결합이 생길 가능성이 있다. 이 같은 문제를 해결하고자하는 방법이 그림 9(C), (D)에 나타난 pLCR과 gap-LCR(G-LCR)¹⁷⁾이다. pLCR의 경우 4개의 oligonucleotide를 사용하나, 5' 쪽 oligonucleotide는 표식염기를 3' 말단에 갖도록 염기서열을 설정한다. 3' 쪽 oligonucleotide와는 2~3 염기의 gap을 갖는다. 이 gap을 메우는데 필요한 3종류만의 기질 nucleotide의 존재하에서 5' → 3' exonuclease 활성을 갖고 있지 않은 Stoffel fragment의 반응으로 genome DNA에 hybrid 결합한 5' 쪽 oligonucleotide의 3' 말단에 nucleotide를 첨가한다. 이 3' 말단에 mismatch가 존재하는 경우에는 이 nucleotide가 첨가되지 않는다. Gap 메움과 동시에 ligase의 존재하

에서 3' 쪽 oligonucleotide와 결합한다. 2가닥 DNA의 해리, DNA polymerase 반응, ligase 반응을 수십 cycle 반복하므로써 결합한 oligonucleotide의 duplex가 증가하게 된다. 그림 9(D)에 나타낸 G-PCR은 target염기 위치만이 gap이 되도록 5' 쪽, 3' 쪽 oligonucleotide를 설정한다. 이 예에서는 gap을 메우기 위해서는 dATP와 dTTP 만이 필요하게 되므로 이 둘의 기질만이 존재하는 상태로 Stoffel fragment의 반응으로 5' 쪽 oligonucleotide의 3' 말단에 1 nucleotide를 첨가한다. Gap이 메워짐과 동시에 ligase 반응으로 3' 쪽 oligonucleotide와 결합한다. 염기서열 다형에 의해 다른 염기대를 갖는 allele에서는 이 기질로 gap이 메워지지 않으므로 ligase 반응으로 결합할 수 없다.

▶ 맺음말

PCR을 기반으로 하는 DNA, RNA의 해석 기술은 이외에도 여러 가지가 개발되고 개량되어 있으나 중요한 몇몇의 원리를 소개하였다. 기술이라고 하는 것은 무엇인가 “알고 싶다, 알고 싶다” 라고 생각한다면 아주 불가능하리라 생각하는 것도 언젠가는 가능한 방법으로 탄생하는 것인 것 같다. 이십 수년전 nearest neighbor 법으로 1년간 10염기에도 못 미치는 염기서열을 해석할 때는 훨씬 좋은 방법이 반드시 있을 것으로 생각하였으나 10년도 지나지 않아서 Maxam-Gilbert법, Sanger법이 개발되어 현재는 자동화까지 이르게 되었다. 여러가지 새로운 기술이 필요한 것은 많으나 PCR에서 우선 무엇보다 기대하였던 것은 DNA의 구조에 관계없이 10 kb, 20 kb를 안정적으로 증폭할 수 있는 long PCR의 출현이었다.



참고문헌

- 1) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. : *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **101**, 263-273(1986)
- 2) Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineus, I., Khorana, H. G. : *J. Mol. Biol.*, **56**, 341-361(1971)
- 3) Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 6427-6437(1989)
- 4) Barnes, W. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2216-2220(1994)
- 5) Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., Higuchi, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5695-5699(1994)
- 6) Forhman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8998-9002(1988)
- 7) Loh, E. L., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., Davis, M. M. : *Science*, **245**, 217-220(1989)
- 8) Ohara, O., Dorit, R. I., Gilbert, W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5673-5677(1989)
- 9) Forhman, M. A. : in “PCR primer” (ed. Dieffenbach, C. W., Dveksler, G. S.), pp. 381-409, Cold Spring Harbar Laboratory Press(1995)
- 10) Welsh, J., MmClelland, M. : *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7215-7218(1990)
- 11) McClelland, M., Arensdorf, H., Cheng, R., Welsh, J. : *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1770-1771(1994)
- 12) Liang, P., Pardee, A. B. : *Science*, **257**, 967-971(1992)
- 13) Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D., McClelland, M. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4965-4970(1992)
- 14) Jones, D. H., Winistorfer, S. C. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 595-600(1992)
- 15) Singer-Sam, J., Riggs, A. D. : *Methods Enzumol.*, **225**, 344-351(1993)
- 16) Barany, F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 189-193(1991)
- 17) Wiedmann, M., Baany, F., Batt, C. A. : in “PCR primer” (ed. Dieffenbach, C. W., Dveksler, G. A. S.), pp. 631-652, Cold Spring Harbar Laboratory Press(1995)

RT-PCR법

I. RT-PCR법

II. Oligo Cap법에 의한 mRNA 5' 말단의 Cloning

I. RT-PCR법

RNA 검출법으로는 RT-PCR법이 개발되기 이전부터 Northern blot analysis, dot blot analysis, nuclease protection method, *in situ* hybridization법 등을 이용하여 왔다. RT-PCR법은 미량 분자의 검출 감도면에서 Northern blot analysis, dot blot analysis, nuclease protection method 보다 우수하고, 조작이 빠르고 간편하다는 점에서 *in situ* hybridization보다 우수하다. 특히 미량으로 존재하는 여러 종류의 시료를 동시에 해석하는 경우에 유용하므로 임상진단에도 폭넓게 응용하고 있다. 또한 RT-PCR법을 SSCP와 조합함으로써 mRNA의 미세한 구조이상을 고감도로 검출할 수 있어 이 방향의 임상응용도 시험되고 있다. RT-PCR법은 RNA 조제, 역전사 효소 반응(RT), PCR 등의 3단계로 나뉘어 진다. 검출감도는 1 세포당 10분자 정도이지만, 실제로는 상기의 3단계에 대응하는 RNA의 회수율, RT반응의 효율, PCR의 효율, 그 중에서도 시료의 DNA 혼입에 의한 증폭반응의 저해 유무 등에 의해 최종산물량이 정해진다.

따라서 특히 미량의 RNA분자를 검출하거나 정량 해석을 목적으로 할 때에는 각 단계에 있어 효율을 가능한 한 높이는 노력이 필요하다. 본 고에서는 RNA의 조제법, RT-PCR법, RT-PCR-SSCP법에 대하여 순서대로 설명한다. 보다 상세한 설명을 필요로 하는 경우는 다른 서적을 참고한다¹⁻³⁾.

1. RNA의 조제

(1) 일반적인 주의사항

RNA를 분해되지 않은 상태로 추출하기 위해서는 추출조작 과정에서 ribonuclease(RNase)의 혼입을 피하는 것이 필수조건이다. RNase는 극히 안정한 효소로 고온에서도 실활되지 않고, 보효소가 없거나 넓은 pH 영역에서도 활성을 유지하므로 혼입되지 않도록 충분한 주의를 기울여야 한다. 외부로부터의 RNase 혼입을 막기 위해서는 ① 가능한 멸균한 기구를 사용할 것 ② Eppendorf tube나 pipette tip은 건열멸균한 것을 사용할 것 ③ 유리기구를 이용하는 경우는 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC) 용액을 처리하여 사용할 것 ④ 조작중에는 고무장갑을 착용할 것 등의 주의가 필요하다.

한편 RNase는 세포 내에도 존재한다. RNA 추출 조작시

세포 구조를 파괴하면 세포내 RNase가 RNA 분자와 접촉하여 이것을 분해한다. 이 내인성 RNase 활성을 제거하기 위해서는 단백질 제거 조작으로 RNase 자체를 제거하거나 RNase 활성을 저해해야 한다. 통상의 RNA 추출조작에 있어서는 내인성 RNase 활성을 제거할 목적으로 세포를 강력한 변성제인 guanidium thiocyanate와 환원제 2-mercaptoethanol로 용해하여 phenol로 추출한다. 이 때 phenol만으로 추출하면 pH7.6 이하의 조건에서는 대부분의 poly(A)⁺ RNA가 phenol 층으로 소실되어 버리므로, phenol에 chloroform을 첨가하고 또 SDS를 사용함으로써 RNA를 수층에서 보존할 수 있다. 아래에 그 두가지 방법을 소개한다.

(2) Acid · Guanidium Thiocyanate/Phenol/Chloroform 추출법(AGPC법)^{3,4)}

이 방법은 1987년에 Chomczynski와 Sacchi에 의해 개발된 방법으로 고순도의 완전한 RNA를 비교적 단시간에 얻을 수 있다. 이 방법은 동물배양세포나 동물조직 등의 각종 재료에 응용할 수 있고 또 비교적 소량의 재료에서도 RNA를 추출할 수 있어 가장 보편적으로 이용되고 있다.

A. 준비

[세포 용해용액 D]

- 4 M guanidium thiocyanate
- 25 mM sodium citrate(pH7.0)
- 0.5% sarcosyl
- 0.1 M 2-mercaptoethanol

Guanidium thiocyanate는 인체에 유해하므로 개봉한 병에 직접 dH₂O, sodium citrate 용액 및 sarcosyl을 첨가하여 65℃에서 용해하도록 Chomczynski는 권장하였다. 이 용액은 실온 보존으로 최소 3개월동안 사용할 수 있다. 2-mercaptoethanol은 사용시에 첨가한다.

[포화 phenol]

RNA grade phenol(Gibco-BRL)을 사용하는 것이 바람직하다. 탈이온수로 포화한 후 사용한다.

[Diethyl pyrocarbonate(DEPC)]

비특이적인 RNA 저해제이다. 유리기구를 세정할 때에는 0.1% 용액을 사용한다. 또 dH₂O에 첨가하여 RNA를 용해하는 경우도 0.1% 농도의 용액으로 한다.

B. 방법

아래의 모든 조작은 eppendorf tube에서 실행하면 간편하다.

- ① 조직의 경우는 적출 후 신속하게 얼음위에서 잘게 나누고, 조직 50 mg에 대해 500 μ l의 비율로 용해 용액을 첨가한 후 glass/teflon homogenizer로 파쇄한다. 용해 용액은 eppendorf tube 1개당 500 μ l씩 분주한다. 배양세포의 경우는 우선 원심분리(300~400 \times g, 3~5분)를 하여 세포를 1개의 eppendorf tube에 최대 5×10^6 개 정도 모으고, 5×10^6 개의 세포당 500 μ l의 비율로 용해 용액 D를 첨가한다.
- ② 세포용해액을 vortex로 재빨리 혼합하여 완전히 균질화한다.
- ③ 가볍게 원심분리하여 용액을 tube의 기저부에 모은다.
- ④ 50 μ l의 2 M sodium acetate(pH4.0)를 첨가하여 vortex하고 원심분리를 반복한다.
- ⑤ 500 μ l의 RNA grade phenol(포화한 것)과 100 μ l의 chloroform/isoamyl alcohol(49:1) 혼합액을 첨가한다.
- ⑥ Vortex로 완전히 혼합하고 얼음에서 15분간 정치한다.
- ⑦ 10,000 \times g에서 4 $^{\circ}$ C, 20분간 원심분리한다.
- ⑧ 상층을 주의를 기울여 새로운 microtube로 옮긴다. 이때 경계층은 절대 피한다.
- ⑨ 1 ml의 ethanol 또는 500 μ l의 isopropyl alcohol을 첨가하여 부드럽게 섞은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 침전한다.
- ⑩ 10,000 \times g에서 4 $^{\circ}$ C, 20분간 원심분리한다.
- ⑪ 상층을 제거하고 침전물을 300~400 μ l의 4 M 세포용해용액 D로 용해한다.
- ⑫ 1 ml의 ethanol 또는 500 μ l의 isopropyl alcohol을 첨가하여 부드럽게 혼합한 뒤 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 침전한다.
- ⑬ 10,000 \times g에서 4 $^{\circ}$ C, 15분간 원심분리한다.
- ⑭ 상층을 제거하고 침전물을 75% cold ethanol로 씻은 후 5분간 원심분리한다.
- ⑮ 50 μ l의 0.1% DEPC 용액 또는 0.5% SDS 용액을 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 용해한다.
- ⑯ 이 상태로 -70 $^{\circ}$ C에서 보존하거나 또는 ethanol 침전 상태로 -20 $^{\circ}$ C에서 보존한다.

(3) 미량 시료에 대한 Guanidium/Cesium Chloride(CsCl) 추출법^{3,5)}

Rappolee가 보고한 방법으로 수천개 이하의 세포로도 RNA를 추출할 수 있다. 이 때 미량의 RNA를 높은 효율

로 침전하기 위해 적당량의 대장균 ribosomal RNA를 담체로 이용하는 것이 좋다.

- ① Eppendorf tube에 침전한 미량의 세포에 100 μ l의 세포 용해용액 D를 첨가한 후 재빨리 vortex로 혼합한다.
- ② Beckman TL-100용의 원심 tube에 100 μ l의 5.7 M CsCl을 주입한다.
- ③ 여기에 ①에서 얻은 세포 용해액을 조심스럽게 넣는다.
- ④ 80,000 rpm으로 2시간 동안 원심분리한다.
- ⑤ Guanidium/cesium chloride를 주의하여 흡인한다.
- ⑥ 침전을 0.1% DEPC 용액 100 μ l로 용해한다.
- ⑦ 10 μ l의 2.5 M ammonium acetate, 200 μ l의 ethanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 침전한다.
- ⑧ 10,000 \times g에서 4 $^{\circ}$ C, 15분간 원심분리한다.
- ⑨ 침전을 70% ethanol로 2번 세정한다.
- ⑩ 침전을 약 1 μ g/ μ l의 농도가 되도록 적정량의 0.1% DEPC 용액으로 용해한다.

2. 역전사효소 반응

(1) 역전사효소(Reverse Transcriptase; RTase)

mRNA 자체는 PCR의 기질이 될 수 없다. 따라서 RT반응으로 mRNA로부터 cDNA를 합성할 필요가 있다. RTase는 RNA-dependent DNA polymerase 활성을 가져 mRNA를 주형으로 상보적인 cDNA를 합성(1st strand 합성)하고 동시에 DNA-dependent DNA polymerase 활성을 가져 합성된 cDNA의 complementary strand를 합성할 수 있다(2nd strand 합성). RT반응에는 통상 avian myeloblastosis virus (AMV) 유래와 molony murine leukemia virus(MoMLV) 유래의 2종류 RTase가 이용된다. AMV 유래 RTase는 상기의 2개 활성뿐만 아니라 mRNA: cDNA hybrid를 강력하게 분해하는 RNase H 활성을 가지므로, 1st strand 합성이 저해되어 긴 cDNA를 합성할 수 없다는 단점을 가진다. 한편 MoMLV 유래 RTase는 RNase H 활성이 비교적 약하므로 이론적으로는 긴 DNA 합성이 가능하지만, 반응의 최적온도가 37 $^{\circ}$ C로 AMV 유래 RTase의 42 $^{\circ}$ C보다 낮으므로 주형 mRNA가 복잡한 고차구조를 가지는 경우에는 cDNA의 신장반응이 저해된다. 이와 같이 AMV 유래 RTase와 MoMLV 유래 RTase는 모두 일장일단을 가지나 필자는 MoMLV 유래 RTase를 선호한다. 또 두 효소는 최적 pH, 최적 염농도 등에서도 차이가 있으므로 주의해야 한다. 최근 Myers

등은 RTase 활성과 PCR 활성 모두를 가지는 *Tth* polymerase를 보고하였다⁶⁾. RT-PCR 반응을 1개의 효소로 수행하면 RT반응을 고온에서 할 수 있으므로 주형 mRNA의 고차구조의 영향을 줄일 수 있다는 점 등의 장점이 있으며 종래의 방법보다 감도가 약 100배 더 증가한다는 보고도 있다. 그러나 RT반응에 Mn^{2+} 이온을 필요로 함에 따라 반응의 정확도(fidelity)가 낮아지는 것이 단점이다.

(2) RT반응에 사용하는 Primer

RT반응의 primer는 목적에 따라 ① oligo(dT)_{12~18} primer, ② 특정 염기서열에 대한 상보적인 primer, ③ random 6 mer primer 등의 3종류를 이용할 수 있다.

Full-length cDNA를 얻고자 하는 경우는 oligo(dT)_{12~18} primer가 유용하다. Target mRNA의 양이 극히 적을 것으로 예상되는 경우에도 oligo(dT)_{12~18} primer는 동일 mRNA분자의 poly(A)⁺의 다양한 부위와 결합하여 복수의 신장반응을 개시할 수 있다. 또 RT-PCR법에 기초한 DDA(differential display analysis)를 할 때는 RT 산물을 일차 정제분획하는 목적으로 oligo(dT)_{12~18} primer의 3' 말단에 A, G, C, (T)를 다양한 조합으로 2염기 정도 붙인 primer를 이용한다.

이에 반해 임상진단이나 정량적 RT-PCR법 등의 경우에는 보다 선택적으로 특정의 염기서열을 증폭할 필요가 있으므로 특정염기 서열에 대한 상보적인 primer를 이용한다. 필자 등은 20염기 정도의 길이를 가진 primer를 이용하여 양호한 결과를 얻었다. 또 random 6 mer primer는 mRNA의 5' 말단 등과 같이 oligo(dT)_{12~18} primer를 이용한 RT 반응으로 신장되기 힘든 영역의 해석이나 임상진단에 있어 target으로 하는 염기서열이 짧아야 좋은 경우 등에 자주 이용된다.

(3) DNA의 혼입에 대한 대책

미량의 mRNA를 검출하는 경우 또는 정량적인 해석을 하는 경우에 가장 큰 문제점은 시료에 genome DNA가 혼입되는 것이다. 일반적으로 2개의 primer를 다른 exon상의 염기서열과 상보적으로 설정하면 설사 혼입한 genome DNA가 cDNA와 함께 PCR의 주형으로 작용하더라도 genome DNA의 경우는 intron도 동시에 증폭되므로 단편의 길이가 다른 mRNA 유래의 RT-PCR 산물과 구별할 수 있고, genome DNA 유래의 intron을 함유하는 단편은 cDNA 유래의 단편보다 길기 때문에 증폭효율이 낮을 것

으로 예상된다. 그러나 genome DNA 유래의 단편이 원하는 cDNA 유래의 단편과 길항적으로 증폭하므로 반응의 정량성에 장애가 된다. 한편 intron을 결실한 유전자나 pseudo 유전자가 존재하는 경우에는 혼입한 genome DNA 유래의 단편과 mRNA 유래 단편의 길이 차이를 구별할 수 없다. 따라서 RNA용액에 DNase 처리하여 혼입한 genome DNA를 완전히 제거할 필요가 있다.

(4) 방법

A. 준비

- Reverse Transcriptase
- RNase Inhibitor
- 10× RT buffer

| | |
|--------|-------------------|
| 750 mM | KCl |
| 500 mM | Tris-HCl(pH8.3) |
| 30 mM | MgCl ₂ |

B. RNA 시료의 deoxyribonuclease(DNase) 처리⁷⁾

① 아래의 용액을 혼합한다

| | |
|-----------------------|--------------|
| Total RNA(20 μ g) | 16.0 μ l |
| 10× DNase buffer | 2.0 μ l |
| RNase Inhibitor | 1.0 μ l |
| DNase(RNase free) | 1.0 μ l |

| | |
|-------|--------------|
| Total | 20.0 μ l |
|-------|--------------|

② 37℃에서 1시간 반응시킨다.

③ 90℃에서 5분간 가열한다.

④ 원심분리하여 얼음위에 놓는다.

이 용액은 직접 RT 반응에 이용할 수 있으나, phenol/chloroform 추출, ethanol 침전으로 RNA를 회수해도 좋다.

C. 역전사효소 반응

(a) Annealing : 특정 염기서열에 대한 상보적 primer를 이용하는 경우

① 아래의 용액을 혼합한다.

| | |
|----------------------------|-------------|
| RNA 용액(1 μ g/ μ l) | 1.0 μ l |
| RT Primer(50 nM) | 1.0 μ l |
| 10× RT buffer | 1.4 μ l |
| dH ₂ O | 6.6 μ l |

| | |
|-------|--------------|
| Total | 10.0 μ l |
|-------|--------------|

② 혼합액을 95℃에서 2분간 가열한다.

③ 55℃에서 1시간 반응한다.

④ 원심분리한다.

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer를 이용하는 경우에는 동일한 반응계에 40~100 pmol 첨가한다.

(b) Primer 신장반응

① 아래의 용액을 혼합한다.

| | |
|---|--------------|
| Primer와 annealing한 RNA 혼합액 | 10.0 μ l |
| Dithiothreitol(100 mM) | 1.4 μ l |
| dNTPs mixture(각 5 mM) | 1.4 μ l |
| RNase Inhibitor | 0.7 μ l |
| Reverse transcriptase(200 units/ μ l) | 0.5 μ l |

| | |
|-------|--------------|
| Total | 14.0 μ l |
|-------|--------------|

② 37℃에서 1시간 반응시킨다.

③ 80℃에서 5분간 가열한다.

④ 원심분리하여 얼음위에 놓는다.

3. PCR

RT반응으로 얻은 cDNA를 주형으로 PCR을 실시함으로써 mRNA를 검출할 수 있다. mRNA를 고감도로 검출하고자 하는 경우는 방사성 동위원소를 이용한 PCR을 한다. 여기에는 표식 primer를 이용하는 경우와 표식 nucleotide를 이용하는 경우의 2가지 방법이 있다.

일반적으로 방사성동위원소를 이용한 PCR은 검출감도가 높으므로 반응을 아주 소량으로도 할 수 있어 방사성 동위원소나 효소, 기질을 최소량으로 할 수 있다. 필자 등은 5 μ l 용량의 PCR로도 양호한 결과를 얻었다^{8,9)}. mRNA 검출을 목적으로 하는 경우는 통상 30 cycle의 PCR을 이용한다. 한편 mRNA의 정량을 목적으로 하는 경우에는 PCR 산물이 지수함수적으로 증가하는 cycle수를 단편별로 예비실험으로 결정할 필요가 있으나 통상 21~25 cycle이 적당하다.

(1) 준비

- T4 polynucleotide kinase
- Taq polymerase
- 10 \times polynucleotide kinase buffer

| | |
|--------|-------------------|
| 500 mM | Tris-HCl(pH8.3) |
| 100 mM | MgCl ₂ |
| 50 mM | Dithiothreitol |
- 10 \times Taq polymerase buffer

| | |
|-----------|-------------------|
| 500 mM | KCl |
| 100 mM | Tris-HCl(pH8.3) |
| 15 mM | MgCl ₂ |
| 0.1%(w/v) | gelatin |

- [γ -³²P] ATP(7,000 Ci/nmol, 160 mCi/ml, ICN Biochemicals)
- [α -³²P] dCTP(3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
- dNTP Mixture(각 1.25 mM)
- 합성 oligonucleotide

(2) 방사성 동위원소(RI)를 이용한 PCR법

mRNA를 고감도로 검출할 필요가 있는 경우, 특히 염기서열의 이상을 검출하기 위해 SSCP 해석을 하고자 하는 경우는 primer를 방사선표식하여 PCR에 이용한다. 이 경우는 ³²P를 기질로 하여 T4 polynucleotide kinase로 primer의 5' 말단을 표식한다.

RT-PCR 산물을 SSCP로 해석하는 경우에는 양측의 primer를 표식하는 것이 mRNA 구조의 이상을 검출하기 위해 반드시 필요하지만 양 primer를 동등한 강도로 방사성표식을 하기 위해서는 좌우 primer 각각에 대하여 별개의 kinase 반응을 해 줄 필요가 있다. 특히 표식한 primer는 정제할 필요가 없고, T4 polynucleotide kinase 반응액의 일부를 직접 PCR 반응액에 첨가한다. 단 kinase 반응액의 성분이 PCR을 저해하지 않도록 kinase 반응은 PCR의 최적 pH인 8.3에서 수행하고, 반응 후 가능한한 소량의 dH₂O로 희석한다. SSCP 해석에서 명료한 signal을 얻기 위해서는 최소량의 PCR 산물을 비변성 polyacrylamide gel로 분리하는 것이 가장 바람직하다. 이를 위해 PCR에 이용하는 primer가 높은 방사활성을 갖도록 표식해야 한다. A, B에 소개하는 것은 PCR 산물을 SSCP 해석하는 것을 염두에 둔 protocol이다.

A. Primer 5' 말단의 RI 표식 (30시료 동시 분석의 경우)

① 다음의 용액을 첨가한다.

| | |
|--|-------------|
| Sense 또는 antisense primer(150 μ M) | 1.0 μ l |
| 10 \times kinase 완충액(pH8.3) | 0.3 μ l |
| [γ - ³² P] ATP | 1.3 μ l |
| dH ₂ O | 1.1 μ l |
| T4 polynucleotide kinase(10 unit/ μ l) | 0.3 μ l |
| Total | 4.0 μ l |

- ② 37℃, 30분간 반응한다.
- ③ 80℃, 2분간 가열한다.
- ④ 원심분리하여 얼음위에 놓는다.
- ⑤ dH₂O 12.0 μl를 첨가하여 primer 농도를 10 μM로 조정한다.

B. RI 표식 primer를 이용한 PCR (1시료 해석의 경우)

Primer 신장반응으로 얻은 cDNA 용액의 일부(1 μl)를 PCR 주형으로 직접 이용한다.

- ① 아래의 용액을 혼합한다.

| | |
|-------------------------------|--------|
| Primer 신장반응 용액의 일부 | 1.0 μl |
| 10× Taq polymerase buffer | 0.5 μl |
| dNTP Mixture(각 1.25 mM) | 0.4 μl |
| RI 표식 sense primer(10 μM) | 0.5 μl |
| RI 표식 antisense primer(10 μM) | 0.5 μl |
| dH ₂ O | 1.6 μl |
| Taq polymerase(0.25 unit/μl*) | 0.5 μl |
| Total | 5.0 μl |

* Taq polymerase는 1× PCR buffer로 희석한다.

- ② PCR thermal cycler로 증폭반응을 실시한다.

초기 열변성 : 94℃, 1분

cycle 반응 : 94℃, 30초 ; 55℃, 30초 ; 72℃, 1분

cycle 수 : 30 cycles(검출을 목적으로 하는 경우),

21~25 cycles(정량을 목적으로 하는 경우)

최종신장반응 : 72℃, 7분

편법으로 94℃, 20초; 60℃, 1분의 2단계를 1 cycle로 해도 좋다. 또 annealing 온도는 primer에 따라 차이가 나므로 최적조건을 검토해야 한다.

C. RI 표식 nucleotide를 이용한 PCR (1시료 해석의 경우)

- ① 아래의 용액을 혼합한다.

| | |
|-------------------------------|--------|
| Primer 신장반응액의 일부 | 1.0 μl |
| 10× Taq polymerase buffer | 0.5 μl |
| dNTP Mixture(각 1.25 mM) | 0.4 μl |
| Sense primer(10 μM) | 0.5 μl |
| Antisense primer(10 μM) | 0.5 μl |
| [α- ³² P dCTP] | 0.2 μl |
| dH ₂ O | 1.4 μl |
| Taq polymerase(0.25 unit/μl*) | 0.5 μl |
| Total | 5.0 μl |

* Taq polymerase는 1× PCR 완충액으로 희석한다.

- ② Cycle 반응은 B-②와 동일하게 실시한다.

D. Polyacrylamide gel 전기영동에 의한 분리

- ① PCR 반응액의 일부(1 μl)를 9 μl의 10% glycerol, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.
- ② 5~6% polyacrylamide gel(90 mM Tris-borate pH8.3, 4 mM EDTA)에 1 lane 당 1 μl씩 loading하고 실온에서 전기영동한다.
- ③ Gel을 여과지상에서 건조한 후 실온에서 X-ray film에 30~60분간 감광하여 signal을 얻는다.

(3) Primer를 방사성 표식하지 않은(non-RI) PCR법

PCR 산물을 RI 표식할 필요가 없는 경우에는 아래의 protocol에 따른다. RI 표식의 경우와 비교하면 검출감도가 떨어지나 간편한 조작으로 다양한 목적에 이용할 수 있다.

- ① 아래의 용액을 혼합한다.

| | |
|-------------------------------|---------|
| Primer 신장반응액의 일부 | 1.0 μl |
| 10× Taq polymerase buffer | 1.0 μl |
| dNTP Mixture(각 1.25 mM) | 1.6 μl |
| Sense primer(10 μM) | 1.0 μl |
| Antisense primer(10 μM) | 1.0 μl |
| dH ₂ O | 3.9 μl |
| Taq polymerase(0.25 unit/μl*) | 0.5 μl |
| Total | 10.0 μl |

* Taq polymerase는 1× PCR 완충액으로 희석한다.

- ② B-②와 동일한 cycle로 PCR 한다.
- ③ PCR 반응액을 2 μl의 25% glycerol, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.
- ④ 3~4% Nusieve:SeaKem(3:1) agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색하여 증폭단편을 검출한다.

4. SSCP(Single Strand Conformational Polymorphism) 해석법

mRNA에 점 돌연변이를 가지는 미세한 구조이상을 검출하기 위해서는 RT-PCR-SSCP법을 이용한다⁸⁻¹⁰⁾. 3-(2)-A, B에서 얻은 RI 표식 PCR 산물의 일부를 그대로 해석에 이용할 수 있다. cDNA의 SSCP해석은 원리적으로 genome DNA의 SSCP 해석에 준한다^{11,12)}.

- ① PCR 반응액의 일부(1 μ l)를 9 μ l의 0.1% SDS, 10 mM EDTA 용액과 혼합한다.
- ② 1 μ l를 취해 100 μ l의 formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.
- ③ 이 희석액을 80℃에서 3분간 가열하여 변성한다.
- ④ 5~6% polyacrylamide gel(45 mM Tris-borate pH8.3, 4 mM EDTA)에 1 lane 당 1 μ l씩 loading한다. 통상 5~10% glycerol을 첨가한 gel과 첨가하지 않은 gel 2종류로 분리한다.
- ⑤ 냉각식 정온 전기영동장치를 사용하여 통상 25℃, 40W에서 2~5시간동안 영동한다.
- ⑥ Gel을 여과지상에서 건조한 후 -80℃에서 X-ray film에 1~12시간 감광한다.

5. 실험 예^{8,10)}

RB 유전자는 사람의 망막아세포종(retinoblastoma)에서 분리된 암 억제유전자로 골육종, 폐암, 유방암, 방광암, 전립선암 등에서도 2개의 대립유전자 모두에 구조이상(일어남)으로써 비활성화되는 것으로 알려져 있다. 그림 1은 사람의 각종 종양 유래 배양세포에 대하여 RT-PCR로 RB mRNA를 검출한 예이다. 배양세포로부터 조제한 total RNA를 주형으로 RB cDNA의 특정 염기서열에 상보적인 20염기의 oligonucleotide를 primer로 역전사반응을 통해 cDNA를 제작하였다. 이 cDNA를 주형으로 RB 유전자의 exon 1과 exon 3의 염기서열에 상보적인 20염기의 합성 oligonucleotide를 primer로 하여 그 5' 말단을 방사성 표식한 후 PCR 하였다. 획득한 증폭단편을 polyacrylamide gel로 분리하였다. 그림 1에 나타난 것처럼 모든 종양세포에서 RB mRNA의 230 bp 단편이 검출되었지만 giant cell 암세포 Lu65에서는 230 bp band가 극히 약하게 나타났으며, 크기가 작은 또 하나의 band가 강하게 검출되었다. 또한 이 짧은 단편은 splicing의 이상에 의해 exon 2의 염기서열이 결실되고 exon 1과 exon 3의 염기서열이 직접 연결하여 생긴 단편이라는 사실을 염기서열 결정을 통해 밝혔다.

그림 2는 그림 1에서 확인한 230 bp 단편을 SSCP로 해석한 결과이다. Giant cell 암세포 Lu65의 230 bp 단편을 single strand로 분리한 2개의 band 모두가 사람의 태반 mRNA의 것과 다른 이동도를 나타내어 단편 내의 염기서

열의 변화를 암시하였다. 염기서열 결정으로 이 이동도의 차이가 RB mRNA의 codon 82의 위치에 종결 codon을 도입하는 점 돌연변이에 의해 생긴 것임을 밝혔다. 또 정상적인 이동도를 나타내는 단편이 확인되지 않음으로써 정상 mRNA가 발현되지 않는다는 사실도 동시에 나타내었다.

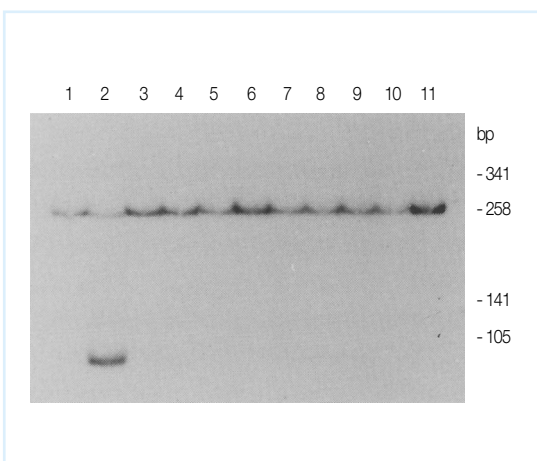


그림 1 RB mRNA의 RT-PCR 해석

10종류의 사람 종양 유래의 배양세포(Lane 1~10: Y79, Lu65, Lu99, C1, PLC/PRF/5, W2, PSN1, HL60, Colo320 HSR(+), Colo320DM(+))과 정상사람 태반에서 전체 RNA를 추출한 후, RB cDNA의 exon 1~3에 상당하는 영역을 PCR로 증폭하여 미변성 6% polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

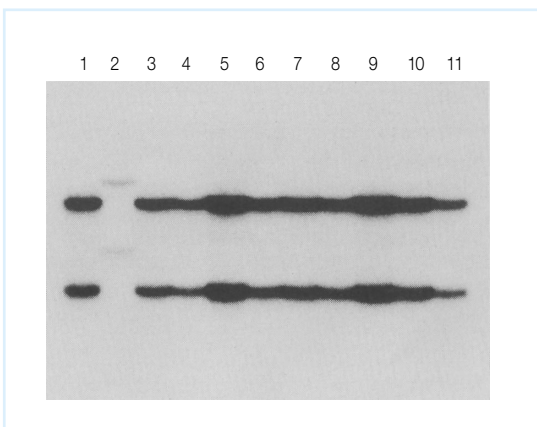


그림 2 RB mRNA의 RT-PCR-SSCP 해석

그림 1과 동일한 단편을 가열하여 변성한 후, 10% glycerol을 첨가한 6% polyacrylamide gel에서 30W로 25℃, 5시간 동안 전기영동하였다. Lane 1~11은 그림 1과 동일.

II. Oligo Cap법에 의한 mRNA 5' 말단의 Cloning

mRNA의 5' 말단을 cloning하는 방법으로는 RACE법 등 몇 가지가 있다. 이 중 필자가 개발한 합성 Oligo Cap법은 지금까지는 없었던 원리를 응용한 것이다. RACE법 등 종래의 방법은 기본적으로 존재하는 cDNA 중에서 가장 긴 것을 분리하기 위한 방법이라 할 수 있다. 역전사 효소는 mRNA의 5' 말단을 넘어가는 신장반응은 할 수 없다고 생각되므로(실제로는 hair pin 구조를 이용하여 더 신장하는 경우도 있지만) 가장 긴 cDNA는 5' 말단까지 신장한 것이라고 생각할 수 있다. 이 원리는 기본적으로 매우 짜임새 있어 보이지만, 실제에 있어서는 cDNA가 제대로 합성되었는지를 확인하는 것이 불가능하므로 획득한 clone이 정말로 5' 말단까지 신장되었다는 확신을 할 수 없다. 특히 개시암호라 생각하는 서열 전에 in frame의 중지암호가 없는 경우 등 매우 불안한 사례가 많다.

이에 반해 Oligo Cap법은 mRNA의 5' 말단에 존재하는 cap 구조를 target으로한 합성 oligonucleotide로 cap 구조를 치환하는 것이 기본원리이다. cDNA가 5' 말단을 가지는지의 판단은 cDNA의 길이가 아니라 oligo cap을 이용한 oligo 염기서열의 cDNA 말단 존재여부를 기준으로 한다. 따라서 이 경우 oligo에 이어지는 염기가 mRNA의 전사개시점에 해당하는 염기라 생각한다. 이 방법으로 mRNA의 5' 말단을 가진 clone을 분리하면, 종래의 방법보다 대체로 긴 것을 잡을 수 있지만 때로는 짧은 경우도 있다. 이 경우에는 복수의 전사개시 부위가 존재하는 것으로 생각해도 좋다.

Oligo Cap법은 RNA를 조작해야 하고 또 필요한 효소도

보다 양질의 것을 사용해야 하므로 널리 사용되지는 않는 방법이다. 그러나 위와 같이 종래의 방법과는 다른 장점이 있으므로 kit화 등의 노력으로 많은 연구자들이 사용할 수 있는 시스템으로 구축하고자 한다.

1. Oligo Cap법의 원리

그림 1에 Oligo Cap법의 원리를, 또 그림 2에 이 방법에 의한 mRNA 5' 말단의 cloning에 대한 전체 흐름을 나타내었다. Oligo Cap법은 본래 mRNA의 개시염기를 결정할 때에 이용하는 Post Labeling법을 근간으로 한 것이다. 즉, acidic pyrophosphatase(TAP)로 cap을 떼어낸 후(그림 3 참조) 노출된 5' 말단의 인산기에 합성 oligonucleotide를 RNA ligase로 연결한다. 단, 세포에서 분리한 mRNA[poly(A)⁺ RNA]에는 분해된 RNA나 mitochondria 유래의 mRNA, cap을 가지지 않는 것도 다수 존재한다. 따라서 cap에 특이적인 결합을 하기 위해 cap을 가지지 않은 RNA의 5' 말단에 존재하는 인산기를 phosphatase(BAP)로 미리 떼어 둔다.

RNA ligase는 single strand RNA 또는 DNA를 연결할 수 있다. 다만, RNA-RNA의 경우에 비해 DNA-RNA간의 연결효율은 1/10로, DNA-DNA의 경우는 1/100로 떨어진다.

실제로 oligo cap의 oligo로서 DNA를 사용해 보았지만, 잘 되지 않는 경우가 많았다. 지금은 RNA와 DNA의 chimera 분자를 제작할 수 있으므로 DNA oligo의 3' 말단에 1~3 염기의 RNA를 결합시킴으로써 RNA oligo와 동등한 효율로 RNA와 결합할 수 있다(Kato *et al.* : personal communication).

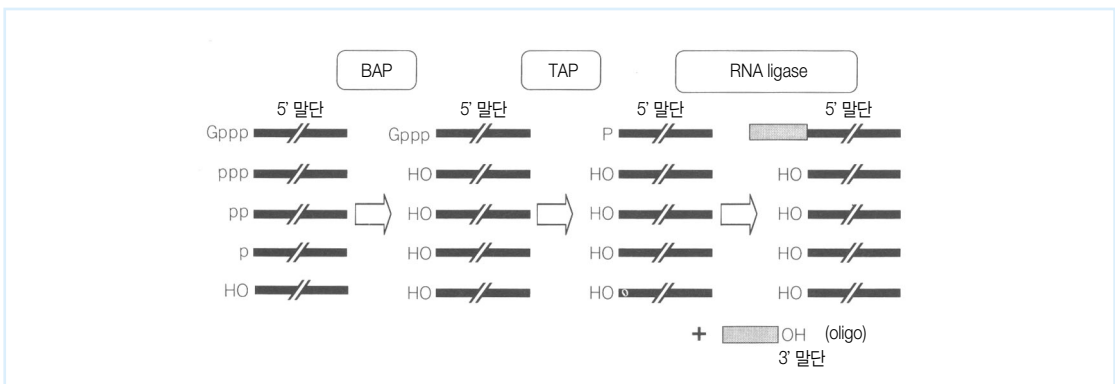


그림 1 Oligo-Cap법의 개요

■ RNA, BAP: bacterial alkaline phosphatase, TAP: tobacco acidic pyrophosphatase.

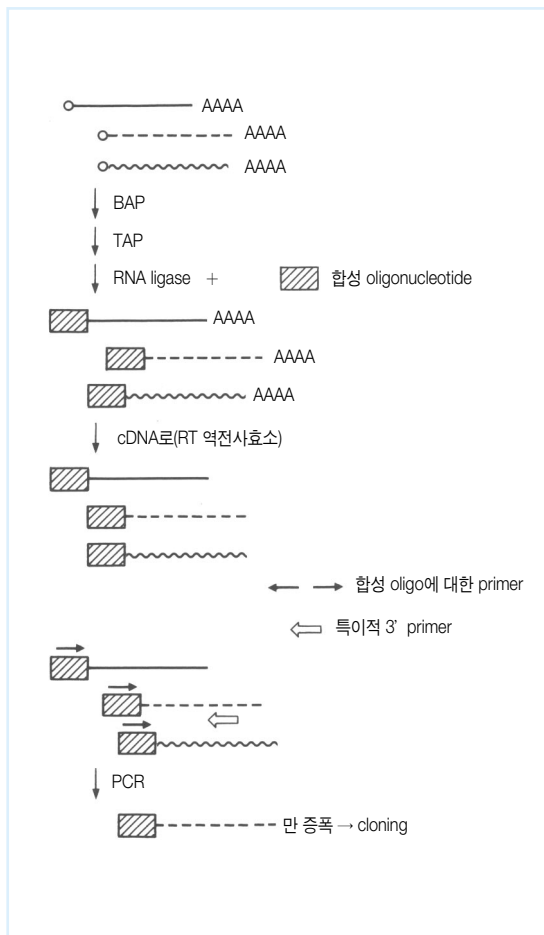


그림 2 Oligo Cap법에 의한 5' 말단 cloning의 전체 흐름

2. Oligo Cap법을 실시하기 전에 고려할 점

(1) RNA

RACE법 등은 cDNA로 전환된 것을 조작하는 것에 반해 Oligo Cap법은 RNA를 조작해야 한다. 따라서 RNA를 조작해 본 경험이 있어야 하며 특히 cDNA library를 제작한 경험이 있는 것이 바람직하다. 또 실험실에 RNA 조작 시스템이 갖추어져 있어야 하며 여러 사람들이 RNase를 사용하지 않는 편이 좋다. 또 RNA에 여러 단계에 걸쳐 효소 처리를 해야 하므로 RNA를 다량 확보해 두어야 한다. 배양세포 유래의 RNA로 목적실험을 하는 것은 좋으나 특수한 조직이나 세포의 것은 충분한 양을 확보하기가 매우 어렵다.

(2) 효소

효소는 물론 RNase free인 것을 사용하여야 한다. 구체적인 protocol에는 필자 등이 사용하는 효소를 소개해 놓았으며 다른 것은 시험해 보지 않은 것도 있으므로 개별적으로 점검해 볼 필요가 있다. 특히 TAP는 양호한 것이 없어 직접 정제하였다. 필자 등이 정제한 것은 보통 사용하는 농도의 10배를 total RNA와 37℃에서 2시간 반응하여도 28S, 18S ribosomal RNA는 거의 변하지 않았다. 최장 20시간을 반응하면 28S, 18S는 분해되고 이 경우 RNase는 RNasin에 의해 부분적인 저해를 받는다.

현재 TAP는 일본의 Wako가 공급하고 있다(TAP HG, Wako). RNA ligase도 lot에 따라 품질의 차이가 많이 나므로 주의해야 한다.

(3) RT-PCR

무사히 oligo cap을 만들었으면 RT-PCR을 실시한다. Oligo dT 또는 목적 mRNA에 특이적인 primer로 cDNA를 제작하고 oligo cap에 사용한 oligo의 염기서열과 목적 mRNA의 기저 부분의 염기서열을 이용하여 PCR을 한다. RACE법의 경우와 마찬가지로 5' 말단의 GC함량이 높으면 증폭할 수 없다. GC 함량이 높다고 생각되면 DMSO를 넣는 등 여러 가지 실험조건을 검토해야 하나 여기에 대해서는 다른 해설서 등을 참고하기로 하고 본 고에서는 Oligo Cap법 고유의 문제점을 지적하고자 한다.

Oligo Cap법으로 수~수십%의 cap을 oligo로 치환할 수 있다. 따라서 통상의 RT-PCR보다 1~2배 더 많은 RNA를 사용하거나 cycle을 증가시켜야 한다. 한편 PCR의 특이성은 5' primer(oligo cap에 사용한 oligo 염기서열에 대응)이 아니라 전적으로 3' primer에 의존한다. 그래서 3' primer는 여러 개를 합성해 둘 필요가 있다. 또 5' primer도 복수로 준비해 두는 것이 좋다.

또 5' primer나 oligo cap에 사용하는 oligo의 염기서열도 문제가 될 수 있다. 첫번째로는 특이적인 primer와의 상호성이 나쁜 경우이다. 두번째로 비특이적인 증폭이 일어나는 경우이다. RNA oligo가 고가라는 것도 필자 등은 충분히 검토하지 않았다. 현재 필자 등이 사용하고 있는 염기서열도 약간 낮은 온도에서 PCR을 하면 비특이적인 산물이 생겨 이상적이지 않은 상태이다.

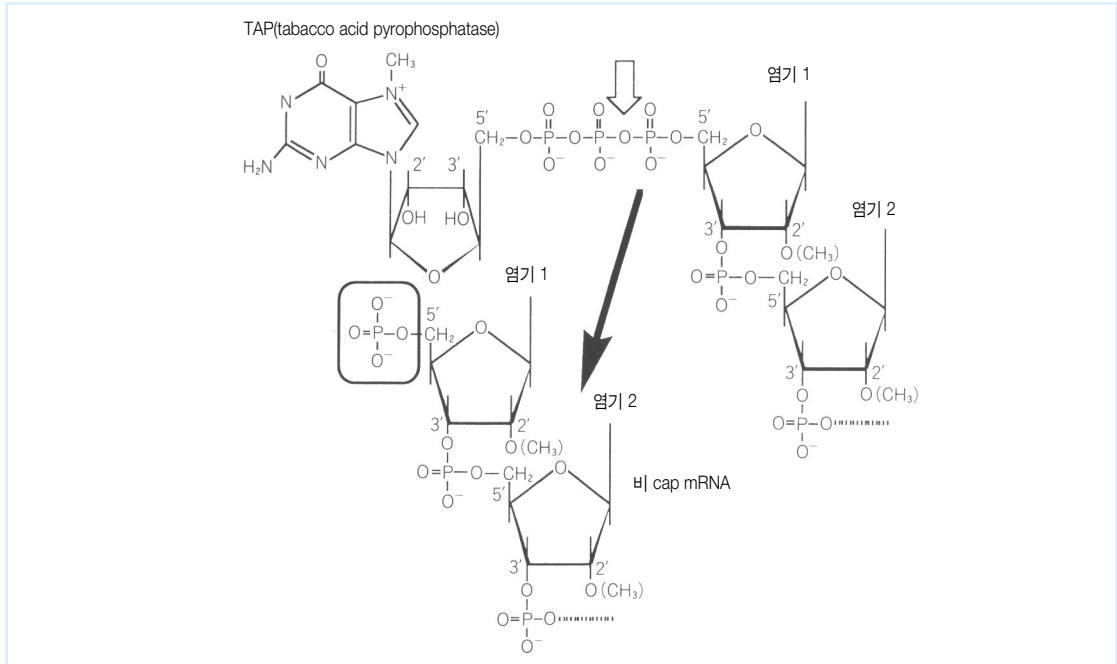


그림 1 mRNA cap 구조의 TAP에 의한 절단

3. Protocol

(1) BAP처리

- ① 5~10 μg 의 poly(A)⁺ mRNA에 대하여 반응용액 100 μl [1 M Tris-HCl(pH7.8) 10 μl , 1 M DTT 1 μl , RNase inhibitor(40 U/ μl) 2.7 μl]를 얼음 위에서 준비한다.
- ② BAP(TaKaRa Code 2110, RNase free)(0.4 U/ μl) 3 μl 를 첨가하여 37℃에서 40분간 보온한다.
- ③ Phenol/chloroform 추출을 2회 실시하여 BAP을 완전히 제거하고, 그 다음 TAP 처리로 완전한 mRNA의 5' 말단에서도 인산기가 제거되는 것을 막는다. 또 ethanol 침전을 한 후 70% ethanol로 세정하여 건조한다. 이때 ammonium ion은 T4 RNA ligase의 활성을 저해하므로 ligation 전의 ethanol 침전에는 ammonium acetate를 사용하지 않는다.

(2) TAP 처리

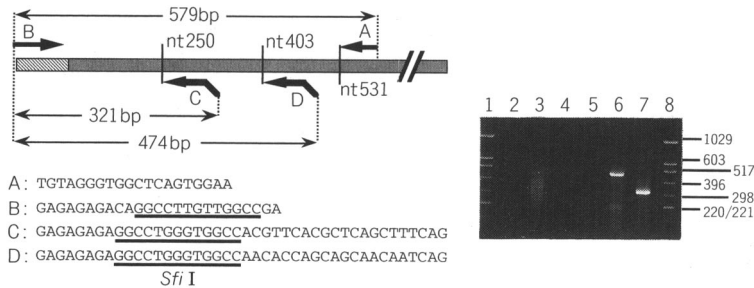
- ① BAP 처리한 mRNA에 대해 반응용액 100 μl (0.5 M sodium acetate(pH5.5) 10 μl , 50 mM EDTA 10 μl , 100 mM 2-mercaptoethanol 10 μl , RNase

inhibitor(40 U/ μl) 2.7 μl)를 얼음 위에서 준비한다.

- ② Tobacco 배양세포로부터 정제한 TAP(Wako, TAP HG를 사용 가능)을 사용직전에 반응용액으로 20 U/ μl 까지 희석하여 그 중 2 μl 를 첨가한 후 20℃에서 30분간 반응한다.
- ③ Phenol/chloroform 추출한 후 ethanol 침전하고, 70% ethanol로 세정하여 건조한다.

(3) RNA Ligation

- ① BAP/TAP 처리한 mRNA에 대해 반응용액 100 μl [0.5 M Tris-HCl(pH7.8) 10 μl , 50 mM MgCl₂, 100 mM 2-mercaptoethanol 10 μl , 5 mM ATP 10 μl , capping에 이용할 RNA oligonucleotide 400 ng, RNase inhibitor (40 U/ μl) 2.5 μl]를 얼음 위에서 준비한다.
- ② T4 RNA Ligase(TaKaRa Code 2111)(50 U/ μl)를 5 μl 첨가한 후 50% PEG8000 50 μl 를 첨가하여 잘 혼합한 다음 20℃에서 3시간 정치한다.
- ③ 200 μl 의 물을 첨가한 후 phenol/chloroform 추출하고 ethanol 침전을 한다. 단 이 때 미반응의 oligonucleotide

그림 4 EF1- α mRNA의 5' 말단의 증식

상세한 내용에 대해서는 본문 실험 예를 참조.

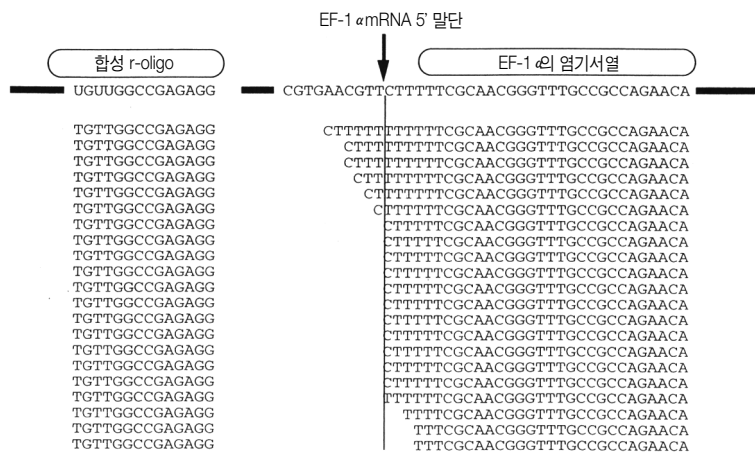
그림 5 EF-1- α mRNA 5' 말단의 구조

그림 3에서 보여준 약 320 bp band를 cloning 하여 그 말단 부분의 염기서열을 결정하였다.

를 제거하기 위해 높은 염농도(ammonium acetate의 최종농도는 2.5 M)에서의 ethanol 세정을 3회 반복한다.

④ 20 μ l의 1 M Tris-HCl(pH7.8)을 첨가하여 반응을 정지하고 미반응 primer 및 분해된 RNA를 제거하기 위해 높은 염농도에서의 ethanol 침전을 2회 반복한다.

(4) 1st Strand cDNA의 합성과 RNA의 제거

- ① 시판하는 cDNA 합성 kit를 사용하여 oligo dT 또는 목적 mRNA의 5' 말단 근방의 기지 염기서열을 primer로 하여 1st strand cDNA를 합성한다.
- ② 반응 후 반응용액에 물을 100 μ l가 되도록 첨가하고 phenol/chloroform 추출을 한다.
- ③ 0.5 M EDTA 2 μ l를 첨가한 후 0.1 M NaOH 15 μ l를 첨가하여 65°C에서 1시간 정치함으로써 주형 RNA를 완전히 가수분해한다.

(5) PCR

- ① 5' 말단의 표식에 사용한 RNA oligonucleotide에 대응하는 DNA oligonucleotide를 5' 측 primer로, 그리고 기지의 염기서열에 제한효소 인식부위를 부가한 것을 3' 측 primer로 하여 1st strand cDNA의 1/20 정도에 대해 PCR을 한다. 또 그 때 5' /3' 측 primer 및 cDNA(-) 대조군을 두어 반응조건이 적당한지 검토한다.

4. 실험 예

Oligo Cap법을 이용하여 사람 배양세포(MDA-MB453)에서 정제한 poly(A)⁺ mRNA의 5' 말단을 표식하고 다음으로 사람의 elongation factor 1- α (EF1- α)의 전사개시 부위에서 downstream쪽으로 531 염기 위치를 3' 말단으로 하는 oligonucleotide A를 primer로 하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 얻은 1st strand cDNA에 대해 oligo capping에 이용한 nucleotide에 대응하는 primer B와 EF-1 α 에 특이적인 2종류의 primer C 및 D와의 조합으로 PCR을 하였다. 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 예상하는 길이의 DNA 단편을 cloning하여 염기서열을 결정 한 결과 21 clone 중 11 clone이 이미 보고된 것과 일치하는 전사개시점을 갖고 있고 1~6 염기가 긴 것으로 6 clone을, 2~3 염기가 짧은 것으로 3 clone을 확인하였는데 이는 전사개시점이 복수로 존재한다고 생각되며 모두가 full length mRNA에서 유래하는 clone이라 생각된다(그림 5).

▶ 맺음말

Oligo-Cap법은 실험실에서 알 수 있는 바와 같이 단독으로 5' 말단을 고정할 수 있을 뿐만 아니라 전사개시 부위의 미세한 구조도 볼 수 있게 해 준다. 이렇게 실시한 해석으로부터 전사의 개시에 대한 새로운 지식을 얻을 수 있고 새로운 기능의 해명도 할 수 있으리라 기대한다.



참고문헌

- 1) Larrick, J. W., Siebert, P. D. : Reverse Transcriptase PCR, Ellis Horwood Ltd., London (1995)
- 2) Mullis, K. B., Ferre, F., Gibbs, R. A. : The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser, Boston (1994)
- 3) Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber-Rolfs, I. : PCR Clinical Diagnostics and Research, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- 4) Chomczynski, P., Sacchi, N. : *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987)
- 5) Rappolee, D. A., Wang, A., Mark, D., Werb, Z. : *J. Cell. Biochem.*, **39**, 1-11 (1989)
- 6) Myers, T. W., Gelfand, D. H. : *Biochemistry*, **30**, 7661-7666 (1991)
- 7) Makino, R., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, **2**, 295-301 (1990)
- 8) Murakami, Y., Katahira, M., Makino, R., Hayashi, K., Hirohashi, S., Sekiya, T. : *Oncogene*, **6**, 37-42 (1991)
- 9) Murakami, Y., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Cancer Res.*, **51**, 3356-3361 (1991)
- 10) Murakami, Y., Sekiya, T. : *in Reverse Transcriptase PCR* (d. Larrick, J. W., Siebert, P. D.), pp. 308-318, Ellis Horwood Ltd., London (1995)
- 11) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989)
- 12) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Genomic.*, **5**, 874-879 (1989)

정량적 PCR

PCR법을 이용한 DNA나 RNA의 정량에 있어서 튜브간에 증폭효율이 다르거나 plateau 효과 등으로 인하여 증폭산물량으로부터 증폭 전의 DNA양을 추정하는 것은 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 내부표준물질을 이용하는 방법이나 Competitive PCR법을 정량에 이용하고 있다. 본 고에서는 특히 RT-PCR법을 이용한 mRNA 정량시의 문제점과 이러한 문제점을 해결하기 위해 개발한 내부표준물질을 이용하는 방법 및 Competitive PCR법에 대해 소개하고자 한다.

PCR법은 내열성 DNA polymerase와 두 개의 합성 oligonucleotide(primer)를 이용하여 목적 영역의 DNA를 특이적으로 증폭하는 방법이다. 따라서 극히 미량의 DNA를 고감도로 검출할 수 있다. 특히 역전사효소에 의한 cDNA의 합성반응과 RT-PCR(Reverse Transcription-PCR)법을 병용함으로써 지금까지 검출이 어려웠던 HIV나 HCV 등 미량의 RNA 바이러스를 검출할 수 있다. 또한 RT-PCR법은 기존의 Northern blotting법 등에 비하여 감도가 아주 높으므로 지금까지 검출하기 어려웠던 미량의 mRNA나 소량의 조직, 세포에서도 mRNA를 검출할 수 있다.

한편 PCR법을 이용하여 DNA나 RNA를 정량할 때, 각 tube간에 증폭효율의 차이나 plateau 효과 등으로 인하여, PCR 증폭산물의 양이 반드시 증폭전의 주형 DNA양을 반영하는 것이 아니므로 증폭산물의 양에서 단순히 증폭전의 DNA양을 추정하는 것은 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 현재는 이러한 문제점을 해결한 내부표준물질(internal standard)을 이용하는 방법이나 Competitive PCR법을 이용하고 있다.

1. RT-PCR법을 이용한 mRNA 정량시의 문제점

RT-PCR법을 이용하여 mRNA를 정량할 때에는 ① mRNA의 추출효율 및 역전사효소에 의한 역전사 반응의 수율 ② PCR 반응시의 증폭효율의 차이 ③ PCR 반응시의 plateau 효과 등의 세가지 사항들이 문제점으로 대두된다.

(1) mRNA의 추출효율 및 역전사 반응의 수율

mRNA를 PCR 반응에 이용하였을 경우의 RT-PCR법의 순서를 그림 1에 나타내었다. 세포나 조직에서 mRNA를 추출한 다음 oligo dT 또는 random primer를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성하고 이 cDNA를 주형 DNA로 하여 PCR 반응을 실시한다. RT-PCR법을 이용하여 mRNA를 정확하게 정량하려면 PCR 반응의 전단계인 mRNA의 추출과 역전사효소 반응시의 수율도 고려해야 한다.

(2) PCR 반응시의 증폭효율의 차이

PCR은 이론적으로 1 cycle 반응에서 목적의 DNA 단편을 2배로 증가시키므로 반응전 최초의 주형 DNA양을 N_0 라

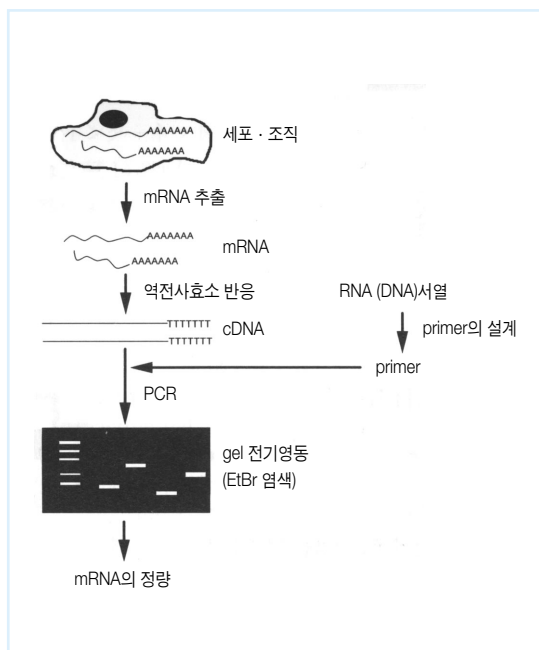


그림 1 RT-PCR법의 순서

세포나 조직에서 mRNA를 추출한 다음 oligo dT 또는 random primer를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 주형 DNA로 PCR 반응과 전기영동을 실시하여 mRNA를 검출, 정량한다.

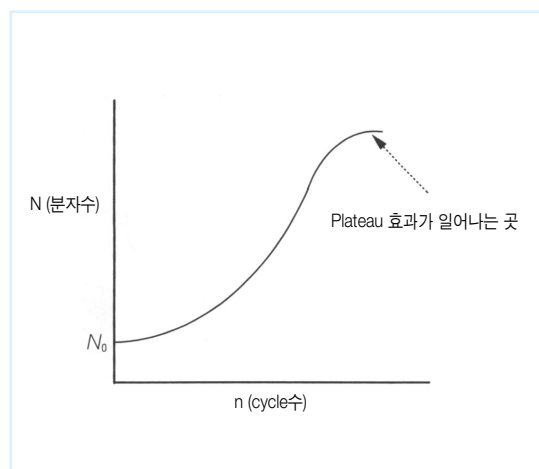


그림 2 PCR 반응시의 Plateau 효과

실제로 PCR을 해 보면 증폭산물의 양이 처음에는 cycle수에 비례하여 대수적으로 증가하지만 증폭산물의 양이 어느 한도를 넘으면 증폭효율이 떨어지면서 최종적으로는 증폭하지 않게 된다. 이런 현상을 plateau 효과라고 한다.

할때, n cycle 후의 반응생성물 N은

$$N = N_0 2^n$$

으로 나타낼 수 있다. 그러나 실제로는 primer의 annealing 효율이나 DNA 가닥의 합성효율이 반드시 100%가 되지는 않으므로 각 cycle의 증폭효율을 E로 하여

$$N = N_0 2^n (1 + E)^n$$

$$(0 \leq E \leq 1)$$

로 나타내는 경우가 많다.

E는 증폭되는 DNA의 염기서열, primer의 염기서열, 증폭되는 DNA의 크기, 반응에 사용하는 각종 시약의 질과 양, 주형 DNA의 순도 등에 영향을 받는다. PCR은 대수적인 증폭반응이기 때문에 증폭효율(E)의 차가 아주 작아도 최종 증폭산물의 양에서는 커다란 차이가 생긴다. PCR법을 이용하여 정량할 때는 이 증폭효율을 고려하여야 한다.

(3) PCR 반응시의 Plateau 효과

실제로 PCR을 해보면 그림 2와 같이 증폭산물의 양이 처음에는 cycle수를 거듭함에 따라 대수적으로 증가하나 증폭산물의 양이 어느 한계를 넘으면 증가가 저하되면서 최종적으로는 증폭하지 않게 됨을 알 수 있다(최종적으로 증폭되지 않는 값을 plateau라고 한다). 이러한 현상을 plateau 효과라고 하며 다음과 같은 원인에 의한 것으로 추정된다.

- ① 증폭산물간의 결합으로 인하여, primer가 주형 DNA에 annealing할 수 없게 된다.
- ② Pyrophosphoric acid 등 DNA polymerase의 활성을 저해하는 물질이 축적된다.
- ③ PCR 반응에 필수적인 물질이 부족하게 된다. 따라서 PCR법을 이용하여 DNA나 RNA를 정량하는 경우에는 이 plateau 효과를 고려하여야 한다.

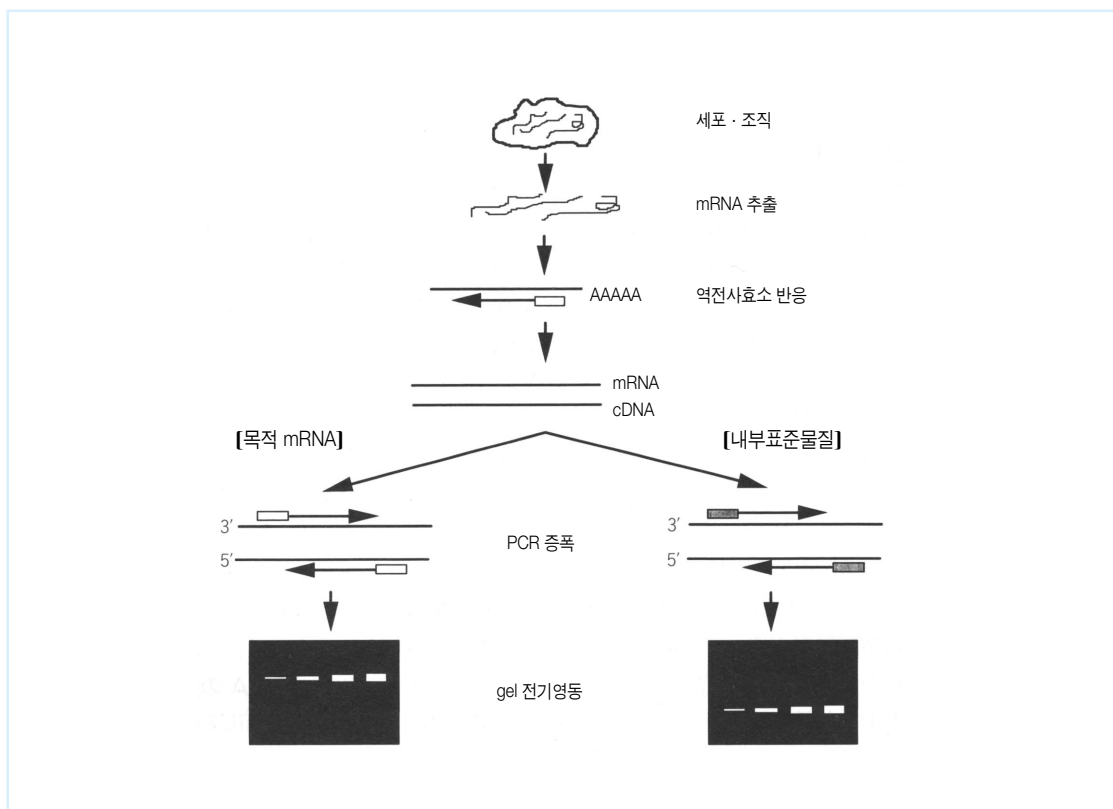


그림 3 내부표준물질을 이용한 RT-PCR법에 의한 mRNA 정량의 원리

세포 또는 조직에서 추출한 mRNA를 oligo dT 또는 random primer를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성한다. 측정하고자 하는 mRNA와 내부표준물질을 각각 동일한 반응 tube와 다른 반응 tube를 사용하여 PCR한다. 증폭산물에 대하여 전기영동과 ethidium bromide 염색하여 증폭된 각 band의 강도를 비교하여 정량한다. (1)band를 잘라내어 액체 scintillation counter로 정량한다. (2)Image scanner나 CCD analyzer로 영상화하고 컴퓨터를 이용하여 정량한다.

2. 내부표준물질을 이용한 RT-PCR법으로 mRNA의 정량

내부표준물질을 이용한 RT-PCR법으로 mRNA를 정량하는 순서를 그림 3에 나타내었다. 조직이나 세포에서 추출한 mRNA를 random primer 또는 oligo dT primer를 사용하여 역전사효소로 cDNA를 합성하고, 측정하고자 하는 mRNA와 내부표준물질을 각각 동일한 반응 tube 또는 다른 반응 tube를 사용하여 PCR반응을 실시한다. 내부표준물질은 거의 같은 수준으로 발현하는 내재성 유전자 즉 housekeeping 유전자의 전사산물(mRNA)을 이용하는 경우가 많다. 현재는 β -actin 유전자나 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PHD) 유전자 등의 mRNA가 자주 이용된다. 그 다음으로 전기영동과 ethidium bromide 염색으로 증폭된 각 band의 강도를 비교하여 정량한다. 통상 32 P로 표식한 primer나 dCTP를 이용한 PCR 증폭산물을 전기영동하여 ethidium bromide 염색한다. gel에서 목적의 band를 잘라내어 liquid scintillation counter로 isotope양을 측정한다. band를 gel에서 절단하지 않고 직접 image scanner(BAS2000, FUJI film사)로 영상화하여 band의 강도를 측정하는 방법도 있다. 또 방사성 동위원소를 사용하지 않고 PCR 증폭산물을 전기영동, ethidium bromide로 염색하여 CCD image analyzer로 각 band의 강도를 측정하는 방법과 최근에는 전기영동을 하지 않고 streptavidin beads를 이용하여 증폭산물을 포획하여 전기적 화학발광법(Q-PCR System)³⁾으로 검출하는 방법도 개발되어 있다. 단, 앞에서 언급한 바와 같이 PCR에는 plateau 효과란 현상이 있으므로, 두 반응물에 대하여 plateau에 도달하기 전의 단계에서 그리고 증폭효율이 거의 같은 것을 함께 비교하여야 한다.

내부표준물질을 이용하는 경우에서 PCR 반응시 cycle수의 증가에 따른 증폭산물의 변화를 그림 4에 모식적으로 나타내었다. 내부표준물질 및 목적 mRNA 유래의 증폭산물이 plateau에 도달하기 전과 증폭효율이 같은 곳(기울기가 같은)을 각각 비교하지 않으면 정확하게 정량할 수 없다. 미리 내부표준물질과 목적 mRNA를 PCR하여 cycle수별로 해석하거나, 시료를 단계적으로 희석하여 PCR함으로써 PCR 반응시의 대수 증폭영역을 확인하고 두 증폭산물에 대하여 증폭효율이 같은 지를 확인해 두어야 한다. Chelly 등은 aldolase A 유전자의 mRNA를 내부표준물질로 이용하여 길이가 길고(14 kb), copy 수가 적은

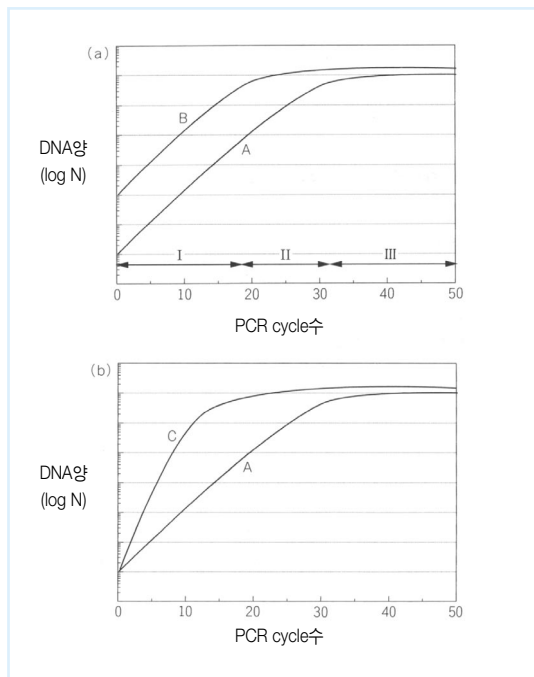


그림 4 RT-PCR 반응시, cycle수에 따른 증폭산물량의 변화

(a)내부표준물질에서 유래하는 증폭산물량(A)과, 목적 mRNA에서 유래하는 증폭산물량(B)의 변화를 PCR의 cycle수별로 나타내었다. 영역 I은 A, B 모두 plateau에 도달하지 않았으므로 정량이 가능하다. 영역 II는 A가 plateau에 도달하지 않았으나 B가 도달했기 때문에 상호 비교가 안되므로 정량이 불가능하다. 영역 III은 A, B 모두 plateau에 도달했기 때문에 정량이 불가능하다. (b)내부표준물질에서 유래하는 증폭산물량(A)과 목적 mRNA에서 유래하는 증폭산물량(C)의 변화를 PCR의 cycle수별로 나타내었다. A와 C는 증폭효율이 다르기 때문에 상호 비교가 안되므로 정량할 수 없다.

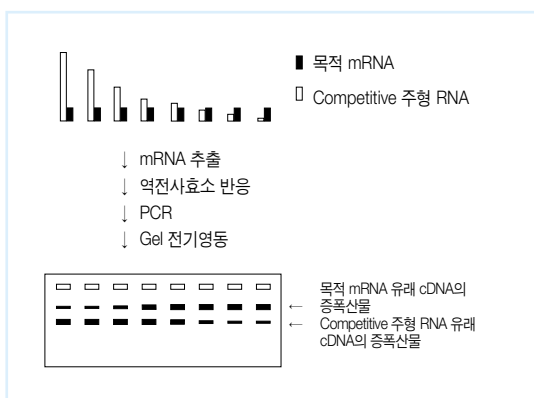


그림 5 Competitive PCR법의 원리

정량하고자 하는 목적 mRNA를 함유하는 시료에 단계적으로 희석한 competitive 주형 RNA를 첨가하여 역전사 반응을 실시한다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 PCR한 후, 반응액의 일부를 gel 전기영동한다. Competitive 주형 RNA 유래의 cDNA 증폭산물은 목적 mRNA 유래의 cDNA 증폭산물과 증폭 크기가 다르므로 식별할 수 있다. 두 증폭산물의 전기영동패턴을 비교하여 강도가 같은 band의 competitive 주형 RNA의 양이 시료 중의 mRNA양이 된다.

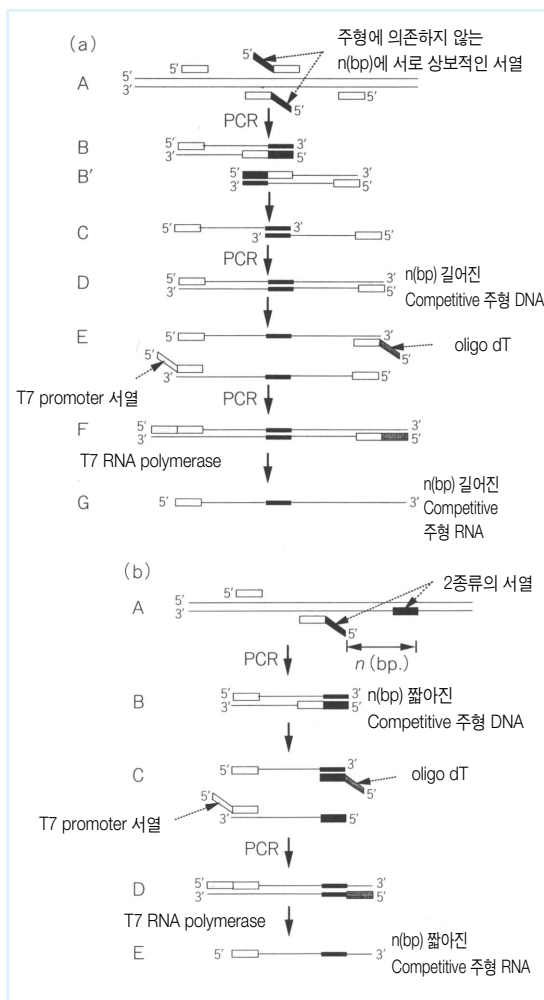


그림 6 목적 mRNA와 상동적인 서열을 갖는 Competitive 주형의 조제법

(a) 주형에 의존하지 않는 n(bp)에 서로 상보적인 서열을 부가한 primer를 이용하여 PCR한다(A). 획득한 PCR 증폭산물(B, B')은 부가한 부분이 서로 상보적이므로 (C)의 단편을 얻을 수 있다. 또, 양단의 primer를 이용하여 PCR하면, (D)의 단편이 얻어진다. (B)의 단편은 (A)에 비하여 부가한 n(bp) 부분이 길어진 competitive 주형이다. 이 주형을 T7 promoter 서열과 oligo dT를 부가한 primer로 PCR하여 이 PCR 산물을 주형으로 하여 T7 RNA polymerase에 의한 전사반응을 실시함으로써 competitive 주형 RNA를 조제할 수 있다. (b) 주형 DNA 서열 상에 n(bp)의 바깥쪽에 DNA 서열을 부가한 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시함으로써 (A)보다 n(bp)만큼 짧아진 competitive 주형 DNA를 조제할 수 있다 (B). 또 T7 promoter 서열과 oligo dT를 부가한 primer로 PCR하고 이 PCR 산물을 주형으로 하여 T7 RNA polymerase에 의한 전사반응을 실시함으로써 competitive 주형 RNA를 조제할 수 있다.

Dystrophin 유전자의 mRNA를 정량하였다⁴⁾. 또, Noonan 등과 Murphy 등은 각각 β -microglobulin을 내부표준물질로 이용하여 MDR1(multidrug resistant) 유전자의 mRNA를 정량하였다^{5, 6)}. Horikoshi 등은 β -actin,

β -microglobulin 유전자의 mRNA를 내부표준물질로 이용하여 Thymidylic acid 합성효소, Dihydrofolate 환원효소, DT-diaphorase 유전자의 mRNA를 정량하였다⁷⁾. 또한 Kinoshita 등과 Yokoi 등은 내부표준물질로서 β -actin 유전자의 mRNA를 이용하여 사람 T세포 백혈병(HTLV-I)의 *tax/rex* 유래의 mRNA, Cyclin B 및 *cdc25* 유전자 유래의 mRNA를 각각 정량하였다^{1, 8)}.

내부표준물질을 이용한 정량법에서는 목적 mRNA의 양이 내부표준물질에 비하여 다소 나타내는 상대적인 결과만을 얻을 수 있으나, mRNA의 추출 효율이나 cDNA의 합성효율은 고려하지 않아도 되는 잇점이 있다.

3. Competitive PCR법에 의한 mRNA의 정량

Competitive PCR법이란 목적 mRNA를 검출하기 위한 primer와 상보적인 서열을 갖고 있으며 분자량 또는 제한효소부위가 목적 mRNA와는 다르지만 그 양을 알고 있는 주형 RNA(competitive 주형 RNA)를 단계적으로 희석한 것을 시료에 첨가하여 mRNA의 추출, 역전사 반응을 거친 후 PCR반응을 실시하여 합성한 목적 mRNA와 competitive 주형 RNA 유래의 증폭산물양을 비교함으로써 목적 mRNA양을 측정하는 방법을 말한다.

그림 5에 competitive PCR법의 원리를 나타내었다. Competitive PCR에서는 PCR 반응시에 competitive 주형 RNA 유래의 cDNA와 목적 mRNA 유래의 cDNA간에 primer의 경쟁이 일어난다. Competitive 주형 RNA가 다량인 경우에는 competitive 주형 RNA 유래의 cDNA가 우선적으로 증폭되나, 목적 mRNA의 양이 많은 경우에는 그와 반대로 목적 mRNA 유래의 cDNA가 우선적으로 증폭된다. Competitive 주형 RNA와 목적 mRNA의 양이 같으면 증폭산물의 양도 같아진다. 첨가한 competitive 주형 RNA의 양은 이미 알고 있으므로 이 양으로 목적 mRNA의 양을 알 수 있다. 한편 DNA(Competitive 주형 DNA)를 competitive 주형으로 이용하는 경우도 있으나, 이 경우는 목적 mRNA 유래의 cDNA를 정량하는 것이 된다. RNA 추출 및 cDNA 합성반응을 실시한 시료에 단계적으로 희석한 competitive 주형 DNA를 첨가하여 PCR 반응을 실시하므로써 cDNA를 정량한다. Competitive PCR법의 최대 장점은 앞에서 설명한 plateau 효과의 영향을 받지 않는다는 점이다. 따라서 내부 표준물질을 이용하는 방법처럼 사전에 대수 증폭영역을 확인할 필요가 없다. 또한 competitive 주형 RNA를 이용하면 RNA의 추출 효

율이나 역전사효소 반응의 수율에 관한 문제도 없다.

Competitive PCR법에는 목적 mRNA와 상동적인 서열을 competitive 주형 RNA(DNA)로 이용하는 방법과 전혀 다른 서열을 이용하는 방법이 있다.

(1) 목적 mRNA와 상동적인 배열을 갖는 Competitive 주형을 이용한 Competitive PCR법

Competitive 주형 RNA(DNA)에는 목적 mRNA의 서열에 부위 특이적인 변이를 이용하여 새로이 제한효소 인식 서열을 도입한 것 또는 십여개의 염기쌍의 삽입이나 결실을 도입한 것을 사용한다. Competitive 주형 RNA(DNA)의 서열은 목적 mRNA와 거의 같은 서열이므로 증폭효율에는 문제가 없다. 제한효소 서열을 도입한 competitive 주형 RNA(DNA)는 PCR 종료 후 증폭산물을 제한효소로 절단함으로써 목적 mRNA 유래의 증폭산물과 competitive 주형 RNA(DNA) 유래의 증폭산물을 전기영동으로 구분할 수 있다. 한편 염기서열을 결실하거나 삽입한 competitive 주형 RNA(DNA)는 서로 분자량이 다르므로 그대로 전기영동하여 목적 mRNA 유래의 증폭산물과 competitive 주형 RNA(DNA) 유래의 증폭 산물을 구

별할 수 있다.

Becker-Andre 등은 새로이 제한효소 서열을 도입한 Competitive 주형 RNA를 이용하여 감자 배양세포 중의 4-coumarinic acid: CoA ligase의 mRNA를 정량하였다⁹⁾. 또 Gilliland 등은 small intron을 갖는 genomic DNA 단편 또는 제한효소 서열을 도입한 cDNA를 competitive 주형 DNA으로 하여 GM-CSF와 IL-3의 mRNA를 정량하였다¹⁰⁾. 제한효소 인식서열을 도입한 competitive 주형 RNA(DNA)의 조제는 시간을 요하는 까다로운 조작이다. Diviacco 등은 PCR 반응을 이용하여 간단히 n 염기쌍의 DNA를 삽입시키는 competitive 주형 DNA의 조제법을 개발하였다¹¹⁾. 또한 Celi 등도 PCR 반응을 이용하여 n 염기쌍이 결실된 competitive 주형 DNA의 조제법을 개발하였다¹²⁾. 그림 6에 위의 두가지 방법을 나타내었다. 또한 한쪽 방향의 primer에 T7 promoter 서열을 그리고 다른 한쪽의 primer에는 oligo dT 서열을 부가한 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시하여 합성한 DNA 단편을 주형 DNA로 하여 T7 RNA polymerase에 의해 competitive 주형 RNA를 조제할 수 있다¹³⁾.

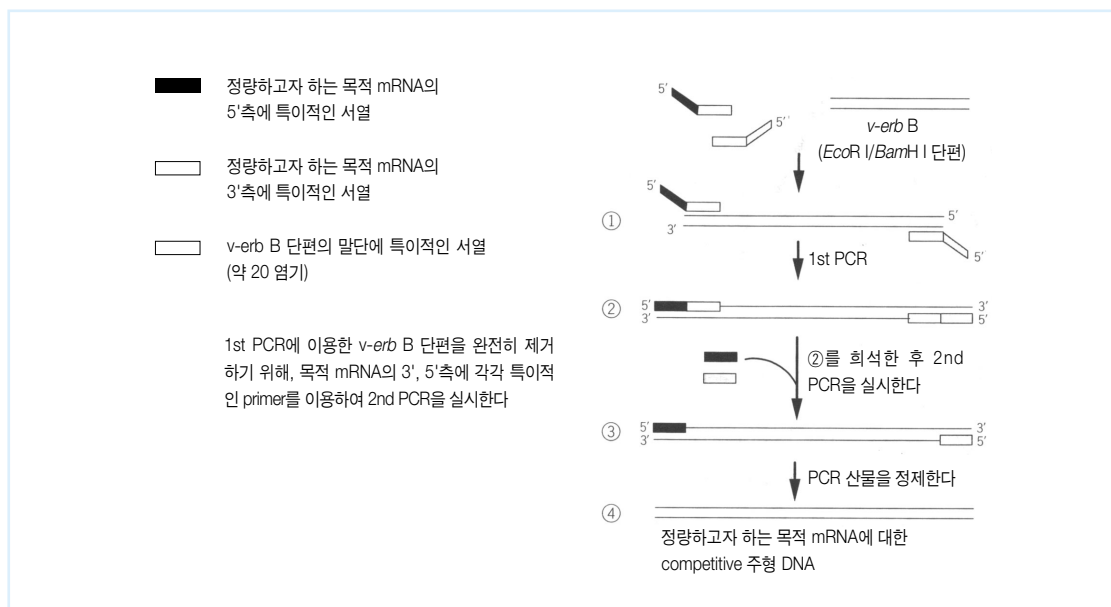


그림 7 목적 mRNA와 전혀 다른 서열을 갖는 competitive 주형 DNA의 조제법

Primer가 annealing하는 부위 이외의 부분이 정량하고자 하는 목적 mRNA의 서열과 다른 서열을 갖는 competitive 주형 DNA를 조제하는 방법을 나타낸다. v-erb B의 EcoR I/BamH I 단편을 이용하여 목적 mRNA의 3', 5' 측에 특이적인 서열을 부가한 primer를 이용하여 PCR을 실시하면, ②의 증폭산물이 얻어진다. 또 v-erb B 단편을 완전히 제거하기 위해 ②를 희석한 다음 2nd PCR을 실시한다. 증폭산물을 정제하면 정량하고자 하는 목적 mRNA에 대한 competitive 주형 DNA를 조제할 수 있다. 단 반응에 사용하는 임의의 단편의 증폭효율이 목적 mRNA 유래의 cDNA와 같은 지를 확인해야 한다.

(2) 목적 mRNA와 전혀 다른 서열을 갖는 Competitive 주형 RNA(DNA)를 이용한 Competitive PCR법

목적 mRNA의 서열과 primer가 annealing부위 이외의 부분이 완전히 다른 서열을 갖는 RNA(DNA) 단편을 competitive 주형 RNA(DNA)로 이용한다. 이 경우는 증폭되는 DNA의 서열이 목적 mRNA와 competitive 주형 RNA (DNA)에서 다르므로 두 주형의 증폭효율이 같은가를 확인하여야 한다.

Siebert 등은 600 염기쌍으로 구성되는 *v-erb* B의 *EcoR* I

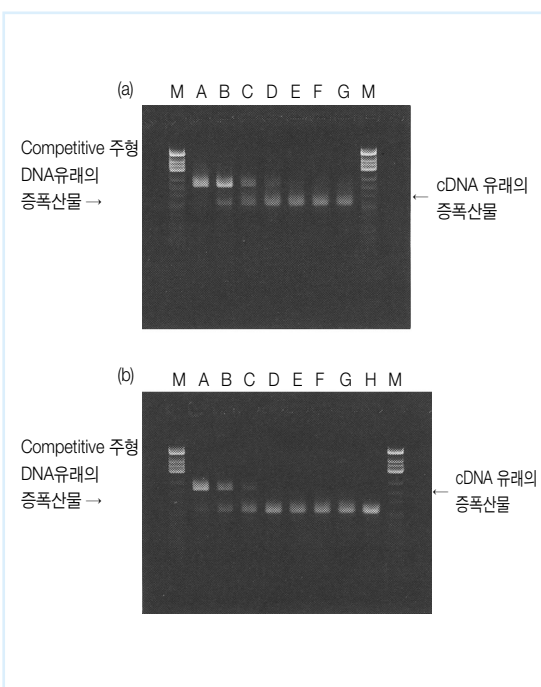


그림 8 목적 mRNA와 heterologous한 배열을 갖는 Competitive 주형 DNA를 이용하여 정량한 실험예

(a) *v-erb* B의 *EcoR* I/*BamH* I 단편을 기본으로 한 competitive 주형 DNA(상품명: PCR MIMICs, Clontech사)를 이용하여 사람 태반 유래의 total RNA($1 \mu\text{g}$)에서 조제한 cDNA 중의 TGF- β 유전자의 양을 측정했다. cDNA 유래의 증폭산물의 양과 competitive 주형 DNA 유래의 증폭산물의 양이 같아지는 곳이 lane C로, 이때 TGF- β 유전자의 양은 1×10^{-18} mol로 정량되었다. [반응조건] RT-PCR kit 사용(상품명: RT-PCR high, TOYOBO). 역전사반응: (42°C, 20분)→(99°C, 5분)→(4°C, 5분), PCR 반응: (94°C, 30초)→(60°C, 30초)→(72°C, 90초)를 35 cycle로 반응하였다. [전기영동] 2% agarose gel 사용(상품명: VisiGel™ Separation Matrix, Stratagene사) (1× TAE buffer), lane M: ϕ X 174/*Hinf* I 단편, lane A: Competitive 주형량 2×10^{-16} mol, lane B: Competitive 주형량 2×10^{-17} mol, lane C: Competitive 주형량 2×10^{-18} mol, 이하 lane G까지 각각 10배 희석을 반복한 것을 사용하였다. (b) 같은 방법으로 HeLa 세포 유래의 total RNA에서 조제한 cDNA 중의 TGF- β 유전자의 양을 측정하였다. cDNA 유래의 증폭산물의 양과 competitive 주형 DNA 유래의 증폭산물의 양이 같아지는 곳은 lane B~C로, TGF- β 유전자의 양은 $1 \times 10^{-17} \sim 1 \times 10^{-18}$ mol로 정량되었다. 또한 competitive 주형 DNA의 희석 계열을 세분하면 정확하게 정량할 수 있으리라 본다. [반응조건] (a)와 같음.

-BamH I DNA 단편을 이용한 competitive 주형 DNA의 조제법을 개발하였다(그림 7)^{14, 15)}. 1st PCR의 primer 배열을 목적 mRNA에 따라 변경함으로써 여러 종류의 mRNA에 대한 competitive 주형 DNA의 조제가 가능하다. 단 조제한 competitive 주형 DNA의 증폭효율은 목적 mRNA의 증폭효율과 거의 같은 것으로 확인되었다. 그림 8은 위의 방법으로 조제한 competitive 주형 DNA를 사용하여 사람 태반 및 HeLa 세포 유래의 total RNA $1 \mu\text{g}$ 에서 조제한 cDNA 중 TGF- β 의 cDNA양을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 단, 이 방법으로 조제한 사람 및 mouse의 cytokines의 mRNA 정량용 competitive 주형 DNA(25 종류)는 시판되고 있다(상품명: PCR MIMICs™, Clontech사). 반복하여 강조하면 이 competitive 주형은 DNA이므로 RNA의 추출 효율이나 역전사효소 반응의 수율에 대한 문제는 검토할 여지가 남아 있다. 정확하게 mRNA를 정량하려면 앞에서 언급한 바와 같이 T7 RNA polymerase를 이용하여 competitive 주형 RNA를 조제하거나 β -actin 등의 내부표준물질에 대하여 competitive PCR 반응을 실시하여 목적 mRNA의 PCR 반응 결과와 비교해야 한다.

▶ 맺음말

내부표준물질을 이용한 RT-PCR법이나 competitive PCR법을 실시함으로써 미량의 mRNA 또는 소량의 조직이나 세포로부터 mRNA의 양을 정량할 수 있다. 내부표준물질을 이용한 RT-PCR법이나 competitive PCR법은 현재 유전자 발현 연구에 널리 이용하고 있으며 생명과학연구의 중심과제인 발생, 분화, 암 등의 기구 규명에 크게 공헌하고 있다. 본 고에서는 소개하지 않았으나 이미 임상분야에서는 HIV, HCV 등 미량의 RNA 바이러스의 정량을 Competitive PCR법을 이용하고 있다.

💡 참고문헌

- 1) Kinoshita, T., Imamura, J., Nagai, H., Shimotohno K. : *Anal. Biochem.* **206**, 231-235(1992)
- 2) Nakayama, H., Yokoi, H., Fujita, J. : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4939(1992)

- 3) Dicesare, J., Grossman, B., Katz, E., Picozza, E., Ragusa, R., Woudenberg, T. : *Biotechniques*, **15**, 152-157(1993)
- 4) Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., Kahn, A. : *Nature*, **333**, 858-860(1988)
- 5) Noonan, D. E., Beck, C., Holzmayer, T. A., Chin, J. E., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., Gazdar, A. F., Willman, C. L., Griffith, B., VonHoff, D. D., Roninson, I. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7160-7464(1990)
- 6) Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T., Bates, S. E. : *Biochemistry*, **29**, 10351-10356(1990)
- 7) Horikoshi, T., Danenberg, K. D., Stadlbauer, T. W., Volkenandt, M., Shea, L. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frösing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P., Danenberg, P. V. : *Cancer Res.*, **52**, 108-116(1992)
- 8) Yokoi, H., Natsyama, S., Iwai, M., Noda, Y., Mori, T., Mori, K., Fujita, K., Nakayama, H., Fujita, J. : *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **195**, 769-775(1993)
- 9) Becker-Andre, M., Hahlbroc, K. : *Nucl. Acids Res.*, **17**, 9437-9446(1989)
- 10) Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2725-2729(1990)
- 11) Diviacco, S., Norio, P., Zentilin, L., Menzo, S., Clementi, M., Biamonti, G., Riva, S., Falaschi, A., Giacca, M. : *Gene*, **122**, 313-320(1992)
- 12) Celi, F. S., Zenilman, M. E., Shuldiner, A. R. : *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1047(1993)
- 13) Vanden Heuvel, J. P., Tyson, F. L., Bell, D. A. : *Biotechniques*, **14**, 395-398(1993)
- 14) Siebert, P. D., Larrick, J. W. : *Nature*, **359**, 557-558(1992)
- 15) Siebert, P. D., Larrick, J. W. : *Biotechniques*, **14**, 244-249(1993)
- 16) Hayashi 등 : *대사*, **29**, 513-517(1992)



Real Time
Thermal Cycler



PCR에 의한 특정영역의 변이 검출 (I)

I. SSCP법

II. PCR에 의한 점돌연변이의 검출

III. 미량으로 존재하는 DNA 변이의 검출

I. SSCP법

생식세포에 발생한 계승상의 염기서열의 변화는 발생, 분화, 세포의 증식 등에 영향을 주지 않는 경우에는 자손에게 전달되며, 이는 각 염색체 독자의 다형서열로써 개인의 식별이 가능하다. 세포의 기능에 영향을 미치는 경우에는 각종 유전병이나 가족성 암으로 연결된다. 체세포에서의 DNA 염기서열의 변화는 그 세포의 암화의 원인이 된다.

Human DNA에서 일어나는 변화에는 유전자의 증폭, 재편성, 결실 등의 큰 변화와 염기치환이나 짧은 염기서열의 삽입, 결손 등의 작은 변화가 있다. DNA의 변화가 큰 경우에는 southern blot법 등으로 검출할 수 있으나 점돌연변이를 비롯하여 DNA상의 작은 변화의 검출에는 몇가지 특별한 방법을 사용할 필요가 있다. 이 경우에는 짧은 DNA단편을 해석할 수 있다는 점에서 PCR로 얻은 DNA 단편을 해석대상으로 삼을 수 있다. 1염기치환의 검출법에는 ① 가장 직접적인 방법인 목적영역의 염기서열 결정법, ② 특정위치의 염기치환만을 검출할 목적인 경우에 편리한 20염기의 합성 oligonucleotide와 표적 염기서열과의 hybrid 형성의 유무를 이용한 allele 특이적인 oligonucleotide hybridization법, ③ 표준 RNA probe와 표준 DNA 단편과의 hybrid를 ribonuclease A로 처리하여 mismatch의 위치를 probe RNA로 절단함으로써 염기치환의 존재와 대략의 위치를 알아내는 mismatch 절단법, ④ PCR 반응으로 40개 정도의 GC 염기서열과 GC clamp를 갖는 DNA

단편을 제작하여, 변성제의 농도가 왼쪽에서 아래쪽으로 조금씩 높아지는 polyacrylamide gel에 전기영동하여 이동속도가 극단적으로 늦어지고 부분적으로 해리한 분자에서의 변화의 차를 이동속도로 비교하여 1염기치환을 검출하는 DGGE법 등이 있다. 이러한 방법은 모두 DNA/DNA, 또는 DNA/RNA hybrid의 형성, 또는 그 해리를 원리로 하고 있는데 필자들이 개발한 single strand DNA 고차구조다형(single-strand conformation polymorphism; SSCP) 해석법은 그 원리가 완전히 다른 것이다.

1. SSCP법의 원리

SSCP법의 원리를 그림 1에 나타내었다. Double strand DNA단편을 single strand로 해리하면 각 strand는 그 염기서열에 의존하는 독자의 고차구조를 형성한다. Maxam-Gilbert법에 의한 염기서열 결정법의 한 step에 있는 바와 같이 이 해리한 DNA strand를 변성제를 함유하지 않는 polyacrylamide gel에 전기영동하면 각각의 고차구조의 차에 따라 길이가 같은 single strand DNA라도 다른 위치에 이동한다. 필자들은 1염기치환에서도 이 single strand DNA의 고차구조가 변화하여 비변성 polyacrylamide gel 전기영동에서 다른 이동도를 나타냄을 발견하였다¹⁾. ³²P로 표식한 primer를 이용한 PCR, 또는 하나의 반응기질에 ³²P 표식 nucleotide를 이용한 PCR 반응으로 목적영역을 증폭함과 동시에 표식한 DNA 단편

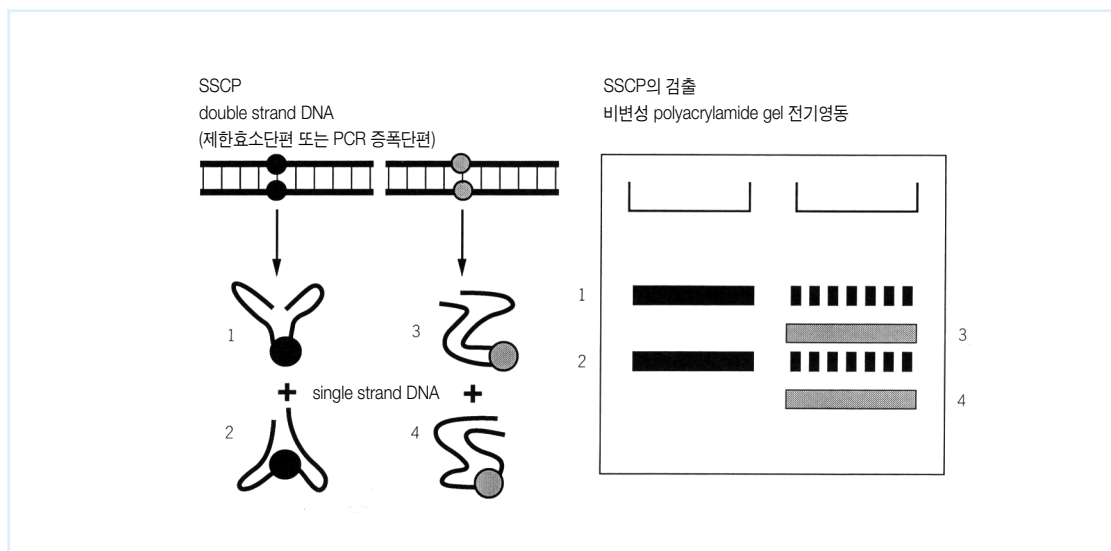


그림 1 Single strand DNA 고차구조다형(SSCP) 해석법의 원리

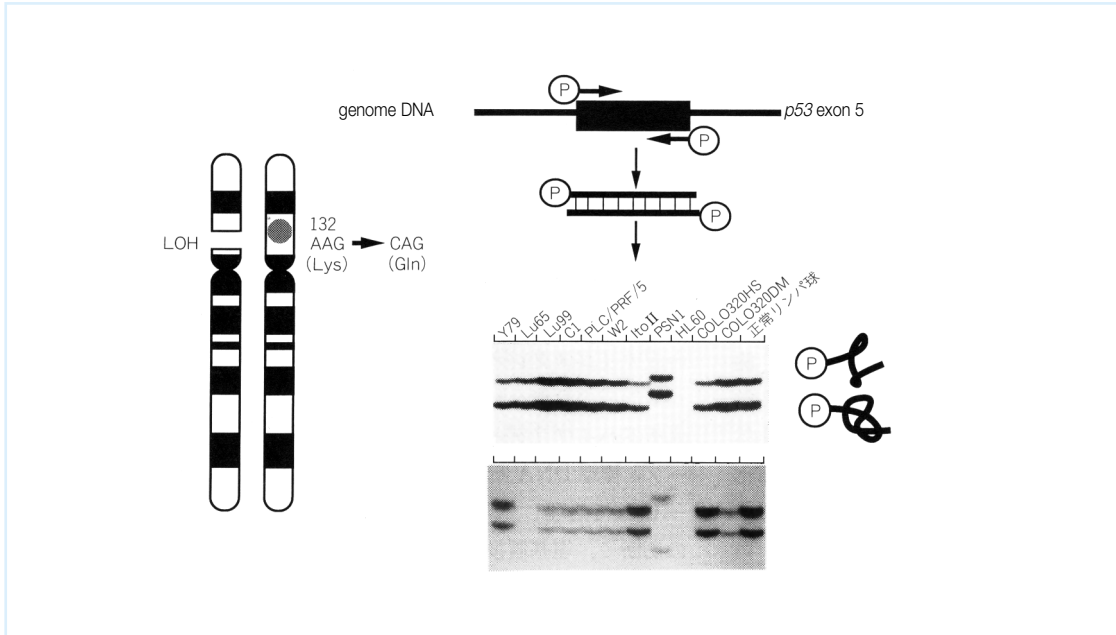


그림 2 PCR-SSCP 해석법에 의한 DNA 이상의 검출

Human 배양세포주, 망막아세포종(Y 79), 폐대세포암(Lu 65, Lu 99), 대장암(C 1), 간세포암(PLC/PRF/ 5), 바이러스종양(W 2), 정소암(Ito-II), 췌장암(PSN 1), 대장암(COLO 320 HS, DM)과 정상림파구의 게놈 DNA 및 cDNA를 해석하였다.

을 얻어 반응액의 극히 일부를 시료로 사용하는 PCR-SSCP 해석은 아주 간편하고 고감도로 염기치환을 검출하는 방법으로 일반화되었다²⁾. 그림 2는 해석으로 human 췌장암 배양세포주 PSN 1에 있어서 암억제유전자 p53의 exon 5를 포함하는 DNA 단편이 다른 이동도를 나타내어 변이가 존재하고 있음을 나타내고 있다. 이상밴드 위치에 있는 gel로부터 DNA 단편을 추출하고 다시 PCR로 증폭한 후 염기서열을 결정하여 codon 132의 1염기 치환을 동정하였다. 또한 SSCP 해석에서 정상 염기서열에 대응하는 밴드가 관찰되지 않는 점으로 보아 PSN 1 세포에서는 p53 유전자의 한쪽의 allele가 결실되어 있다는 것도 동시에 밝혀졌다. 그리고 RNA를 cDNA로 변환한 후 SSCP 해석으로써 mRNA의 상태도 파악할 수 있었다.

2. 사용하는 기구

(1) PCR용 Thermal Cycler

TaKaRa사의 PCR Thermal Cycler GP, Dice, 각 제조사의 Thermal cycler등을 사용한다. 480 이외의 기종들은 mineral oil이 필요없기 때문에 조작이 간편하다.

(2) Polyacrylamide Gel 전기영동장치

염기서열 결정용 장치를 사용한다. 크기가 20 cm(W)×40 cm(H)인 2장의 유리판 사이에 두께 0.3 mm의 polyacrylamide gel을 제작하고 1 lane당 5 mm의 폭으로 사용한다. 영동 중의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 20 cm×26 cm×0.3 cm의 알루미늄판을 유리판에 설치하고 송풍기(2대)로 양쪽에서 강하게 공냉한다. Water jacket/강제 항온식 전기영동장치 AE-6160형 sequencer SSCP [ATTO]를 사용하면 30 cm(W)×40 cm(H)의 유리판으로 50 검체를 해석할 수 있다. 이 경우 송풍기는 필요없지만 순환식 항온수조가 필요하다.

3. 사용하는 시약 · 시료

① 표준 nucleotide

[γ -³²P]ATP(160 mCi/ml, 7000 Ci/ mmol, ICN), 또는 [α -³²P]dCTP(10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham Bioscience)

② Polynucleotide kinase(10 U/ μ l, TaKaRa사)

③ PCR Amplification Kit

Taq DNA Polymerase(5 U/ μ l), 10 \times PCR 완충액(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(pH8.3), 15 mM MgCl₂, 0.1%(w/v) gelatin), 4 dNTP 용액은 PCR Kit에 들어있는 각 deoxyoligonucleotide를 혼합 희석하고 각각의 농도를 1.25 mM로 한다.

④ Mineral oil(Light, Sigma Aldrich)

GeneAmp PCR System 9600, TaKaRa Thermal Cycler GP, Dice를 사용하는 경우에는 불필요

⑤ 50% acrylamide 용액

Acrylamide/*N*, *N*-methylene-bis-acrylamide의 비율을 49:1 또는 99:1로 한다.

⑥ 50% glycerol

⑦ 1.6% 과황산암모늄

⑧ TEMED(*N*, *N*, *N'*, *N'*-tetramethyl-ethylenediamide)

⑨ DNA 시료

Proteinase K/Phenol-chloroform법으로 조제한다. DNA는 TE 용액(10 mM Tris-HCl(pH7.0), 1 mM EDTA)으로 보존하며, 20 ng/ μ l의 농도가 되도록 이온교환수로 희석하여 반응에 첨가한다.

⑩ Primer

Primer oligonucleotide는 그 합성을 외부로 주문하거나 DNA 합성기를 이용하여 조제한다. 후자의 경우 trityl기로 보호되어 있는 상태에서 합성을 완료한다. 암모니아수로 보호기를 제거한 후 Oligonucleotide Purification Cartridge(OPC)로 정제한 후 TE 용액으로 고농도로 녹인 후 -20 $^{\circ}$ C에서 동결 보존한다. 10 μ M 용액을 조제하여 반응에 사용한다.

4. 사용하는 용액의 조제

① 10 \times polynucleotide kinase 완충액(500 mM Tris-HCl(pH8.3), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT)를 조제한 후 200 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보존한다.

② Formamide 색소(F-dye) 용액(95% formamide, 10 mM EDTA(pH7.5), 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)을 정제하여 4 $^{\circ}$ C에 보존한다. Formamide는 이온교환수지(Amber Light MBI)로 탈이온화한 것을 사용한다.

③ 10 \times TBE(0.9 M Trizma base, 0.9 M Boric acid, 20 mM EDTA)를 조제하여 실온에 보존한다.

5. PCR

(1) 5' 말단 표식 Primer를 이용한 PCR³⁾

Primer의 5' 말단표식(80 반응분)은 5 μ l의 polynucleotide kinase 반응액(1 \times polynucleotide kinase 완충액, 2 μ M primer 1, 2 μ M primer 2, 4.6 μ M [γ -³²P] ATP, 1 U/ μ l polynucleotide kinase) 내에서 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하여 실시한다. 이 반응액에 225 μ l의 이온교환수, 40 μ l의 10 \times PCR buffer, 20 μ l의 4 dNTP를 첨가하여 320 μ l의 표식 primer(labeled primer; LP)액으로 한다. -20 $^{\circ}$ C에 보존하면 수주동안 사용할 수 있다.

LP액 40 μ l에 대하여 0.5 μ l(최종농도, 0.06 U/ μ l)의 Taq DNA Polymerase를 첨가한다. 이 PCR 용액 4 μ l씩을 PCR용 0.5 ml tube에 분주하고 각각에 시료 DNA(50 ng/ μ l) 1 μ l를 첨가하여 5 μ l의 mineral oil을 중층하여 수초간 원심한다. PCR 반응에 있어서의 primer와 4 dNTP의 최종농도는 각각 25 pM과 62.5 μ M이다. PCR 반응시 처음에는 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 완전히 DNA를 변성시킨 후, 30~40 cycles(예를 들면 1 cycle: 변성 94 $^{\circ}$ C 0.5분, annealing 55 $^{\circ}$ C 0.5분, DNA Polymerase 반응 72 $^{\circ}$ C 1분) 증폭한다.

(2) 표식 Deoxynucleotide를 기질로 이용한 PCR

20 반응분(80.5 μ l)의 PCR 용액(1 \times PCR 완충액, 200 pM primer 1, 200 pM primer 2, 25 μ M 4dNTP, 1.3 μ M [α -³²P] dCTP, 0.03 U/ μ l의 Taq DNA Polymerase)을 조제한 후 이 중 4 μ l씩을 PCR용 0.5 ml tube에 분주한다. 각 시료 DNA(50 ng/ μ l) 1 μ l를 첨가하고 5 μ l의 mineral oil을 중층하여 수초간 원심한다. 반응은 표식 primer를 이용하는 방법과 동일하다.

6. SSCP 해석

PCR 반응용액(5 μ l)에 45 μ l의 F-dye 용액을 첨가하여 total 50 μ l가 되도록 약 10배로 희석한다. 80 $^{\circ}$ C, 5분간 열변성한 후 1 μ l를 polyacrylamide gel에 전기영동하여 해석한다. Signal이 강한 경우에는 F-dye의 양을 늘려 희석배율을 높인다.

SSCP gel 제작용액은 10 \times TBE(1.5 ml), 50% acrylamide액(3 ml), 1.6% APS(ammonium persulfate)(1 ml)에 이온교환수를 첨가하여 30 ml로 만든다. Glycerol을 첨가하는 gel의 경우에는 최종농도 5~10%가

되도록 50% glycerol을 첨가한다. 두 장의 gel 제작용 유리판(20 cm×40 cm) 사이에 spacer(두께 0.3 mm)를 끼워넣어 조립한다. 유리판의 표면은 세제로 세정한 후 온수로 씻어내린다. 물은 paper towel로 닦아내고 에탄올을 적신 Kim's wiper로 제거한다. 귀가 붙은 유리판은 표면을 실리콘으로 처리하여 둔다. 위 용액에 30 μ l의 TEMED를 첨가하여 잘 혼합하고 귀가 붙어있는 유리판을 윗쪽으로 하여 유리판사이에 주입한다. 유리판을 수평으로 유지하고 comb의 평탄한 부분을 삽입하여 gel이 굳기를 기다린다. Gel이 다 굳게 되면 냉각장치가 있는 영동조에 고정한다. 선풍기로 공냉할 경우에는 알루미늄판을 한쪽으로 밀착하여 영동조에 고정한다. 영동조를 0.5× TBE로 채운다. Comb를 빼내고 PCR액 1 μ l를 F-dye 용액으로 희석 변성하여 전기영동한다.

전기영동은 표준적으로는 실온(20~25℃)에서 30~40 W의 정전력으로 영동한다. 이동도의 차이는 온도에 영향을 받지 않지만 분리가 불충분한 경우에는 4~25℃ 사이에서 최대 이동도의 차이를 나타내는 온도를 검토한다. 냉각장치를 겸한 영동조를 이용하면 재현성이 좋은 결과를 얻을 수 있다. 공냉의 경우에는 유리판 양쪽에서 선풍기로 강하게 바람을 보낸다. 이동도는 염기서열, 온도, glycerol의 유무에 따라 다르기 때문에 영동시간은 예비실험으로 설정한다. 전기영동이 끝난 gel을 Whatmann 3 MM 여지에 옮기고 SaranWrap으로 덮어 gel dryer로 건조한 후 X선 필름에 감광한다. 이때 스테플러로 세 군데를 고정해 둔다. 이동도의 차가 거의 없는 경우에는 단시간 감광하고 감도가 약한 경우에는 장시간 감광하면 쉽게 검출된다.

7. SSCP 해석으로 검출한 변이의 동정

(1) Allele의 분리⁴⁾

SSCP 해석의 gel 전기영동으로 분리한 정상 DNA 단편을 포함한 밴드와 변이 DNA 단편을 포함한 밴드부분을 건조 gel에서 각각 잘라낸다. Autoradiogram을 제작할 때에는 겔과 X선필름을 고정한 스테플러의 위치와 건조한 gel과 autoradiogram의 위치를 맞춘다. Light box위에서 면도날이나 cutter knife 등으로 필요한 단편을 잘라낸다. 잘라낸 겔 조각을 1 ml 원심튜브에 넣고 20 μ l의 이온수를 첨가하여 80℃에서 15분간 가열한 후 1,500 rpm으로 수분간 원심분리한다. Single strand DNA를 포함하는 상층액 1 μ l를 이하의 반응에 사용한다

(2) 분리한 DNA의 증폭

상기의 추출상층액(single strand DNA) 1 μ l를 첨가하여 20 μ l의 반응액(1× PCR 완충액, 125 μ M 4dNTP, 1 μ M primer 1, 1 μ M primer 2, 0.1 U/ μ l Taq DNA Polymerase)으로 PCR 반응을 실시한다. 반응조건은 앞에서 언급한 바와 같다.

(3) 증폭 DNA의 정제

미량용 원심분리식 농축/탈염장치를 이용하여 PCR 산물로부터 과잉 primer 및 완충액 등을 제거한다. 실온에서 PCR용액(20 μ l)에 500 μ l의 이온교환수를 첨가하여 3000×g, 10분간 원심분리를 2회 반복한다.

(4) Cycle Sequencing Reaction

PCR 산물의 약 1/10양을 사용하여 반응한다. 염기서열의 결정에는 시판 kit을 사용한다

8. 문제점

(1) Primer의 설정

통상 한 쌍의 20 bp의 합성 oligonucleotide를 primer로 이용하여 목적 DNA 영역으로부터 증폭되는 DNA 단편의 길이가 300~350 bp 이하가 되도록 primer의 위치를 설정한다. 이 정도의 길이로 해석하면 1염기치환에 의한 이동도의 차를 고효율 및 90% 이상의 고감도로 검출할 수 있다. Strand의 길이가 길어짐에 따라 검출감도의 저하가 예상된다. 불행히도 PCR로 증폭한 DNA 단편이 단일하지 않고 부산물이 많은 경우에는 주형 DNA상의 인접 염기서열 위치에 다시 primer를 설정한다.

(2) Radio Isotope 표식법의 선택

시료수가 많을 때는 표식 primer를 사용하는 것이 경제적이고 효율도 좋다. 그러나 primer의 확인이나, 시료수가 적을 때 또는 PCR 반응이 어려울 때는 표식 nucleotide로 표식하는 것이 더 간편하다.

(3) 전기영동의 조건

Glycerol을 함유하는 polyacrylamide gel을 사용하면 1염기치환에 의한 이동도의 차이를 더 쉽게 검출할 수 있다. 그러나 glycerol을 첨가하지 않은 gel에서 이동도의 차이를 나타내는 경우도 있으므로 glycerol을 포함하는 gel과 포함

하지 않는 gel을 모두 해석하는 것이 좋다. Glycerol의 농도는 5%이든 10%이든 기본적으로는 차이가 없다. 또한 저온(4~10℃)에서 complementary strand간의 분리도가 높아 이동도의 차이가 쉽게 검출되는 경우도 있다. 따라서 실온에서 glycerol을 첨가한 gel, 첨가하지 않은 gel, 저온에서 glycerol을 첨가하지 않은 gel 등 3가지로 전기영동함으로써 누락없이 검출할 수 있다.

분리형태는 gel의 온도에 의존하므로 일정온도를 유지할 수 있는 water jacket을 장착한 전기영동장치를 이용하면 보다 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있다.

(4) Sequencing

모든 lane에 밴드가 있는 경우에는 DNA polymerase의 물리적 정지나 주형 DNA의 2차구조가 원인이라고 판단된다. 이 경우에는 sequencing의 반응온도를 올려주는 *Tth* polymerase를 사용하거나, SSB(single strand binding) 단백질, Dimethyl Sulfoxide(DMSO) 등을 첨가해주면 유효하다고 한다. Sequencing 반응이 잘 되지 않을 때는 반대쪽의 상보가닥을 주형으로 하는 primer extension sequencing을 해 본다. 잘라낸 gel에서 추출한 DNA를 주형으로 사용한 PCR 산물의 수량이 부족해서 원인이 되는 경우도 있으므로 PCR 산물을 확인하고 실험을 진행한다. 또한 Microcon으로 정제할 때 최종 회수 용량이 20 μ 이하가 되게 농축/탈염하면 선명한 결과를 얻을 수 있다.

▶ 맺음말

통상 암의 수술재료에는 상당한 양의 정상세포가 혼재되어 있기 때문에 해석결과가 약한 signal로 검출되는 경우가 많다. SSCP 해석에서는 통상 DNA 단편의 이동도가 다른 것으로 signal을 검출하기 때문에 약한 signal이라도 암 DNA에 특이적이면 자신있게 염기치환의 존재를 알 수 있다. 이처럼 암세포가 불과 수% 정도밖에 포함되어 있지 않은 시료에서도 암 DNA에 있어서의 이상을 검출할 수 있는 것은 PCR-SSCP 해석법의 이점 중의 하나이다.

PCR-SSCP 해석법의 최대 특징은 DNA 단편상의 미지의 위치에서 발생한 1염기치환을 검출할 수 있다는 점이다. 따라서 점돌연변이의 검출뿐만 아니라 수백염기에 한 개 존재하는 것으로 알려져 있는 다형에 의한 염기치환도 그 대부분 검출이 가능하고 이들 다형에 의한 염기치환을 allele를 구별하기 위한 genetic marker로서 이용할 수 있다.

검출효율면에서는 PCR로 해석영역을 증폭할 때 두 개의 primer 양쪽을 모두 표식한 것을 이용하거나 표식 nucleotide를 기질로 사용하므로써 상보성 가닥의 양쪽을 표식하고, 또한 DNA 단편의 길이가 300~350 bp 이하가 되도록 primer를 설정하여 5% 또는 10%의 glycerol을 함유한 polyacrylamide gel로 전기영동함으로써 모든 염기치환을 90% 이상의 효율로 검출할 수 있다고 생각한다. 물론 염기서열중에는 1염기치환이 어느 쪽 상보가닥에도 고차구조에 변화를 주지 않는 경우도 있지만 그 빈도는 5% 이하로 추측되고 있다.

염기치환이 존재하는 DNA 단편을 전기영동시 이동도의 차이로 분리하기 때문에 두 allele의 분리 정제가 가능한 것도 이 방법의 커다란 특징이다. 분리한 밴드위치의 gel에서 DNA를 추출하고 PCR을 이용하여 염기서열을 결정함으로써 각 allele를 동정 및 확인할 수 있다.

Isotope의 사용은 임상응용에 있어서는 난점이지만 이 문제는 비표식 PCR 산물을 이용하여 SSCP 해석을 실시하여 gel속의 DNA를 은염색으로 검출하는 방법, 형광표식한 primer를 사용하여 PCR 산물을 autosequencer로 해석하는 방법 등으로 해결하고 있다.

II. PCR에 의한 점돌연변이의 검출

PCR을 이용한 유전자 진단법 중에서 돌연변이의 유전자 이상을 검출하는 방법은 이미 알고 있는 점변이를 검출하는 방법⁵⁻⁸⁾과 미지의 점변이를 screening하는 방법^{9, 10)} 등 크게 2종류로 구별된다. 본 고에서는 PCR로 이미 알고 있는 유전자 이상을 고감도로 검출하는 방법중의 하나로서 이용되는 MASA법(mutant allele specific amplification)¹¹⁾의 원리와 그 응용예를 소개한다.

1. MASA법의 원리

MASA법은 약 20 염기로 구성되는 변이 DNA 특이적 합성 oligonucleotide를 제작하여 주형 DNA와 내열성 polymerase로 PCR을 실시하므로써 변이 allele만을 특이적으로 증폭하여 gel 전기영동 상에 나타나는 밴드로 돌연변이를 검출하는 방법이다.

이 방법은 그림 1에 나타낸 바와 같이 변이부분을 함유하는 DNA 단편을 증폭할 때 변이부분이 한쌍의 primer 사이에 오도록 primer를 준비한다. 3' 쪽의 primer에는 정상 염기서열에 해당하는 염기가, 5' 쪽 primer에는 변이에 해

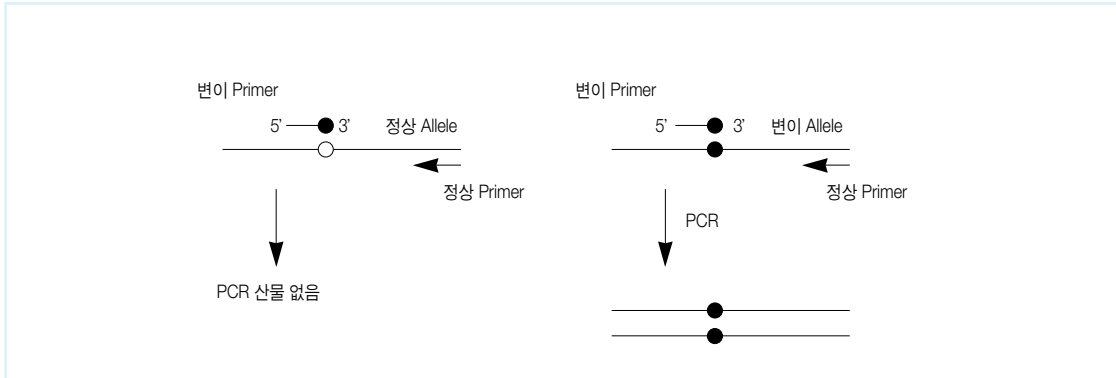


그림 1 변이 Allele 증폭법의 원리

변이 Allele의 1 염기치환 서열과 상보성을 갖는 primer를 이용하여 PCR반응을 실시함으로써 변이 allele를 특이적으로 증폭한다

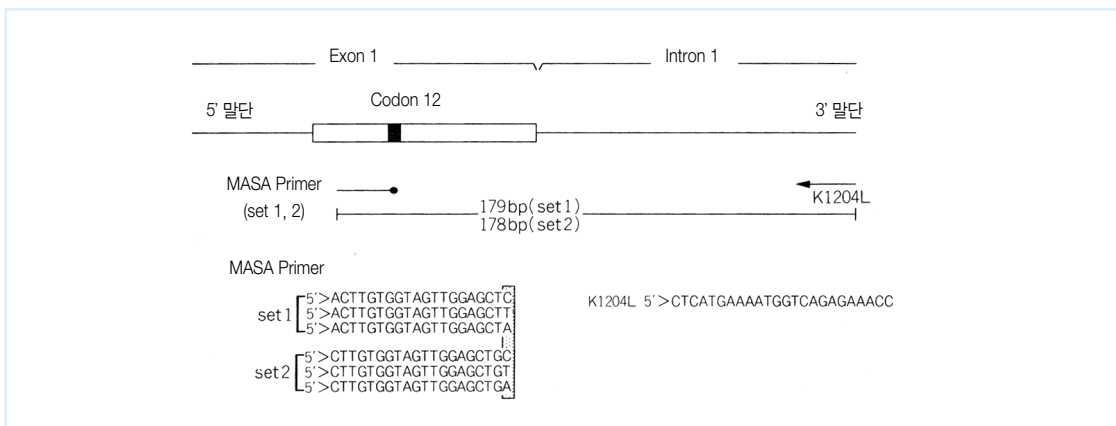


그림 2 K-ras codon 12에서의 MASA primer의 염기서열

Codon 12 GGT(Gly)의 1염기치환의 검출에 사용하는 primer는 set 1(3 종)과 set 2(3 종)의 6 종류를 제작한다

당하는 염기가 3' 말단이 되도록 설계한다. 이상 allele는 효율적으로 증폭되는데 반해 정상 allele는 증폭효율이 극단적으로 떨어지도록 엄밀하게 PCR 조건을 설정함으로써 gel 상에는 변이 DNA가 존재하는 경우에만 양성밴드가 검출되도록 한다. 본 고에서는 이 방법을 이용하여 human 암에서 점돌연변이를 검출한⁽²⁾ 사례를 소개한다.

2. 변이 Allele 특이적 Oligonucleotide(변이 Primer)의 제작

K-ras 유전자는 human 암에서 점돌연변이를 갖는 것으로 알려져 있는 암유전자^{13, 14)}로, exon 1 서열 내부의 codon 12, 13과 exon 2의 codon 61에서의 점변이가 암을 일으키는 원인으로 알려져 있다.

따라서 K-ras의 점변이가 일어나기 쉬운 codon을 표적으로 하여 primer를 제작한다. 1 염기에 대하여 세 개의 염기가 치환될 가능성이 있으므로, 그림 2와 같이 5' 측의 primer로는 3' 말단에 변이염기에 해당하는 염기를 갖는 20 염기로 구성된 3종류의 primer를 혼합한 것을 이용한다. 3' 측의 primer K1204-L은 codon 12, 13의 양방향에 사용한다.

3. PCR 조건

PCR의 각 과정에서의 온도와 시간은 사용하는 PCR의 장치(동일 회사의 동일 기종이라도 미묘하게 다르므로 주의가 필요)와 주형 DNA의 농도, primer의 Tm 값 등에 따라 크게 달라지나 대략적인 Tm 값은 아래의 식을 이용하여 구할 수 있다.

$$Tm(^{\circ}C) = (4 \times \text{primer 서열중의 G+C의 수}) + 2 \times (A+T \text{의 수})$$

① 열변성은 94℃, 30초, ② annealing은 $X(Tm \pm 10)^{\circ}C$, 90초, ③ 신장반응은 70℃, 90초이고 ①에서 ③을 1 cycle로 하여 30~40 cycles 반응한다. gel 전기영동 상에서 밴드를 관찰할 때 비특이적인 signal을 양성으로 판정하지 않도록 시료 DNA와 양성 대조(positive control), 정상 대조 및 주형을 함유하지 않는 것을 대조(negative control)로 하여 동일 조건에서 PCR 반응을 실시한다. 즉, 정상 DNA와 주형을 함유하지 않는 것이 negative control이므로 positive control만 검출되도록 조건을 설정할 필요가 있다. 특히 annealing 온도의 설정이 중요하므로 충분한 조건 검토가 필요하다.

4. 주형

PCR에 이용하는 주형 DNA의 농도는 일정량으로 조정하여 사용한다(50~300 ng/ μ l). DNA의 농도와 PCR에 사용하는 양을 일정하게 맞추는 것이 false positive, false negative를 방지하는 하나의 방법이 된다. 또한 이 방법에서는 체액이나 혈액중의 세포, 수술 후의 생표본, 파라핀조직에서 추출한 DNA를 모두 사용할 수 있다.

5. 전기영동

Ethidium Bromide를 함유하는 2% agarose gel의 well에 5~10 μ l의 PCR 산물을 넣고 marker와 함께 약 100 V의 정전압으로 전기영동한다. 그림 3은 대장암의 수술 생표본에서 추출한 종양 DNA와 정상 점막 DNA, 그리고 동일 환자의 임파절 DNA를 대조로 하여 MASA primer로 PCR반응을 실시하여 그 산물을 전기영동한 것이다. 암조직과 동일한 DNA 변이 단편이 임파절에서도 확인되어 임파절 전이 양성으로 진단되었다.

표 1 대장암에서의 임파절 전이 진단과 예후

| 임파절 전이 진단 | 재발 | |
|-----------|----|----|
| | + | - |
| gn(+) | 27 | 10 |
| gn(-) | 0 | 34 |
| 계 | 27 | 44 |

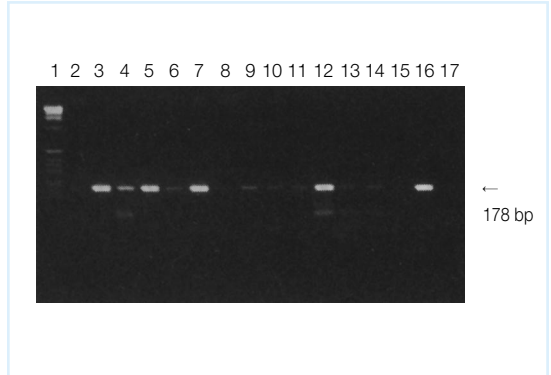


그림 3 MASA법에 의한 대장암의 임파절 전이 진단

1 : DNA size marker, 2 : 정상 점막 DNA, 3 : 종양 DNA, 4~14 : 임파절 DNA, 15 : 정제수, 16 : 양성 대조, 17 : 정상 대조

6. MASA법에 의한 대장암의 임파절 진단

이 방법으로 대장암의 미소 임파절 전이를 검출할 수 있는가를 검토하였다. 수술시에 원격 전이가 인정되지 않은 대장암 수술 증례에서 DNA를 추출하여, 먼저 원발소에서의 K-ras, p53 유전자의 변이를 검색하였다. K-ras의 변이는 codon 12, 13, 61을 MASA법으로 검색하고 p53의 변이는 exon 5~8을 sequencing함으로써 동정하였다. 원발소에서 변이가 동정된 증례에 대해서는 원발소에 소속한 임파절에 원발소와 동일한 유전자 변이를 갖는 세포가 존재 하는지를 조사하기 위하여 각 변이에 해당하는 MASA primer를 설계하고 임파절에서 추출한 DNA를 MASA법으로 검색하였다. 원격 전이가 없는 수술 증례에서 병리 조직학적으로 no로 진단을 받았음에도 불구하고 5년 이내에 재발한 증례 45예와, 대조군으로는 no이면서 수술 후 5년 경과해도 재발하지 않은 증례 75예에 대하여 동일한 방법으로 유전자에 의한 임파절 전이를 진단하였다.

원발소에 K-ras, 또는 p53의 변이를 인정한 증례는 no 재발에 45예 중 27예, no 비재발에 75예 중 44예이며 이들 증례의 임파절에 대해 검색하였다. 표 1에 나타난 바와 같이 유전자 진단에서 임파절 전이 양성 (gn(+))으로 판명된 37예 중 27예는 5년 이내에 재발하고 유전자 진단에서 임파절 전이 음성 (gn(-))으로 판명된 34예는 수술 후 5년이 경과해도 모든 예에서 재발이 관찰되지 않았다. 이처럼 종래의 병리진단에서는 생각지도 못한 미소 임파절 전이가 예후에 영향을 주고 있을 가능성을 강력하게 시사하였다.

▶ 맺음말

MASA법은 PCR 기기와 전기영동장치 및 반응시약이 있으면 실시할 수 있는 비교적 간단한 방법이다. 중요한 것은 적절한 PCR primer의 설계와 PCR 조건이며 이를 충분히 검토하면 재현성이 높은 정확한 결과를 얻을 수 있다. 또한 변이가 염기서열과 관련되어 있는 경우에는 primer의 설계에 따라서는 1 염기치환 뿐만 아니라 응용도 가능하다.

III. 미량으로 존재하는 DNA 변이의 검출

PCR에 의한 1염기치환의 검출은 PCR 증폭산물의 allele 특이적 hybridization법, direct sequence법 등의 개발로 PCR법의 개발 당초보다 훨씬 용이하게 되어 간단한 유전자 변이의 검출법으로서 보급되고 있다. 단, 이러한 방법으로는 1염기의 치환을 갖는 변이 유전자와 변이가 없는 유전자가 혼재하는 경우, 변이 유전자의 비율이 약 20% 이하일 때에는 정상 유전자의 영향으로 검출이 불가능하였다. 극히 소량의 비율로 존재하는 변이 유전자를 검출할 수 있으면 암 특이적 유전자 변이를 검출할 수 있으며 암의 유전자적 진단, 약제내성 등의 특징을 갖는 미량의 변이 바이러스의 존재 진단 등에 응용할 수 있다.

Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP)법, 변성 구배 겔 전기영동법(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE)법, nucleotide extension법이 고안되어 변이 유전자 비율의 3%정도까지 검출할 수 있게 되었다. 변이 유전자의 검출감도가 가장 높은 것은 allele 특이적 PCR이다. 이 방법은 primer의 3' 말단에 mismatch가 존재할 때 PCR의 효율이 저하되는 것을 응용하여 3' 말단을 변이 특이적 염기로 설정하여 PCR하는 것으로 amplification refractory mutation system, mismatch amplification, mutant allele specific amplification 등 보고자에 따라 호칭이 다양하다.

필자들은 이 방법을 응용하여 K-ras 유전자의 codon 12에 변이를 갖는 유전자의 비율을 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 까지 검출할 수 있는 방법을 확립하고 체장암 환자의 체액, 말초혈 등에 극소량 존재하는 변이 ras 유전자를 검출함에 따라 체장암의 유전자 진단을 시도해 왔다²⁾. Allele 특이적 PCR법을 개량한 내용을 덧붙여 변이 유전자의 검출 감도 향상에 필요한 요인에 대해서 설명한다.

1. Primer의 설정

Allele 특이적 PCR의 경우, 3' 말단에 검출하고자 하는 1 염기변이가 오도록 설계한다. 또한 이 primer는 통상의 20염기보다 짧은 14~17염기가 효과적인 것으로 보고되어 있다¹⁶⁾. 여기서는 변이 검출 primer로는 14염기를, 쌍을 이루는 antisense primer로는 통상 20염기를 사용하였다(그림 1). 변이 검출 primer를 20염기로 한 경우에는 1염기변이의 차를 검출하는 효율이 떨어졌다.

Primer 3' 말단의 1염기변이의 PCR 증폭 효율에 대한 영향은 그 부위와 mismatch의 조합에 따라 크게 다르므로 예상하기 어렵다¹⁸⁾. 이 시스템은 C:C와 C:T mismatch에 효과적이며, CGT, GTT형 변이유전자는 10^5 배까지 식별이 가능하였으나 C:A mismatch는 효과가 나빠 GAT형 변이 유전자는 10^4 배에 머물렀다.

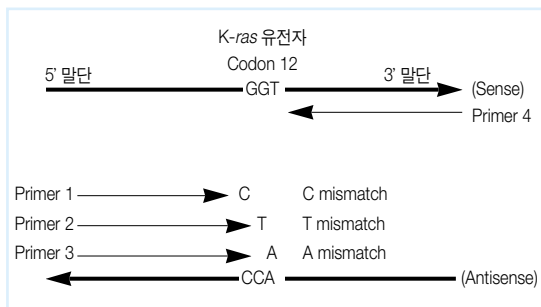


그림 1 primer의 설계

체장암에서 인정되는 K-ras codon 12의 3종류의 변이를 검출하기 위해 3' 말단에 변이형에는 특이적이지만 정상형과는 mismatch를 갖는 primer 1, 2, 3을 제작하였다. 각 정상인 K-ras codon 12의 염기서열 GGT에 대하여 CGT, GTT, GAT의 변이를 검출하도록 설정하고 각 변이 유전자를 검출하기 위하여 primer 1-4, 2-4, 3-4의 조합으로 동일검체를 사용하여 별개의 3종류의 PCR 반응을 실시하였다.

2. Hot Start

PCR로 목적하는 유전자를 증폭하기 위해서는 cycle 초기의 반응이 정확하게 이루어지는 것이 중요하다. Taq polymerase는 70℃ 전후의 최적온도보다 더 낮은 온도에서도 활성을 갖고 있기 때문에 PCR의 변성단계 이전에 섞어두면 특이성이 낮은 증폭이 일어난다. 이같은 현상을 방지하기 위하여 변성단계에서 비교적 반응액이 고온에 있을 때 Taq polymerase를 작용하게 하는 hot start라는 방법이 고안되었다¹⁹⁾. 이는 1염기변이의 식별효율 향상에 필수적인 방법이다(그림 2).

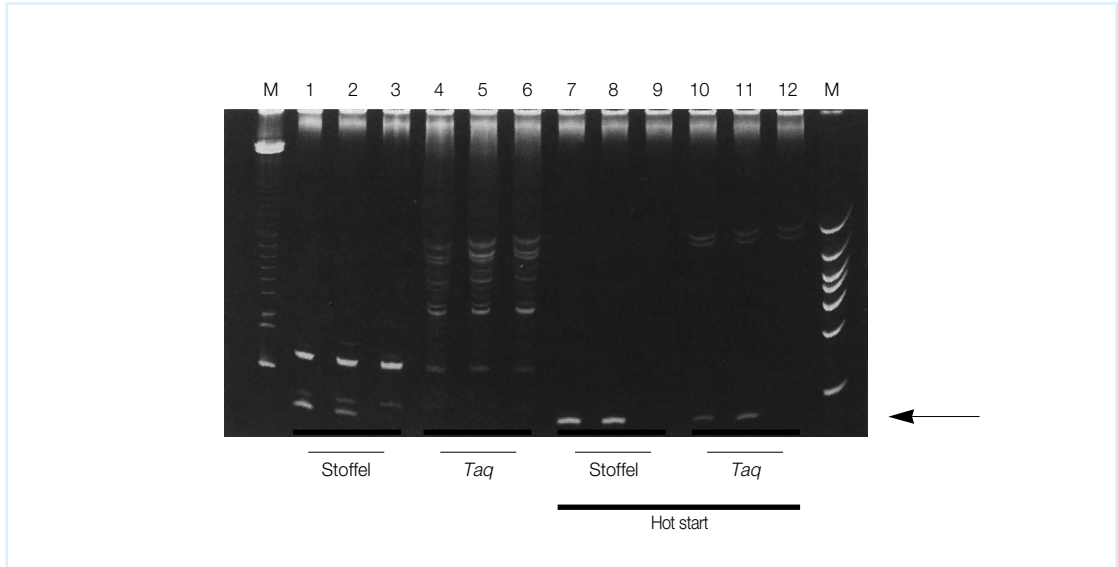


그림 2 Hot start법과 DNA polymerase, Stoffel fragment의 조합효과

K-*ras* codon 12의 QGT형 돌연변이체를 검출하는 primer 1과 4(그림 1)를 사용하여 hot start의 유무, DNA polymerase의 차이에 의한 효과를 나타낸다. 검체로서 lane 3, 6, 9, 12는 변이가 없는 human DNA 100 ng을 lane 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11은 human DNA 100 ng 중 QGT형 돌연변이체를 0.1 ng 함유하는 것을 사용하여 PCR하였다. 오른쪽 끝의 M은 marker이며 크기는 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1000 bp이다. 화살표는 기대되는 증폭산물의 크기를 나타낸다. Lane 1~6은 Hot start법을 사용하지 않고 PCR하였는데 비특이적인 증폭산물이 많다. 또한 lane 3에 나타난 바와 같이 돌연변이체를 갖지 않는 검체에서도 *ras* 유전자가 증폭되었다. Lane 7~12는 hot start를 사용한 것으로 비특이적 증폭은 상당히 억제되었다. 또한 Taq polymerase, Stoffel fragment를 사용하면 통상의 Taq polymerase 사용시에 인정되는 1000염기 전후 크기의 큰 비특이적 증폭산물도 소실되면서 목적산물의 증폭이 증가하였다(lane 7, 8).

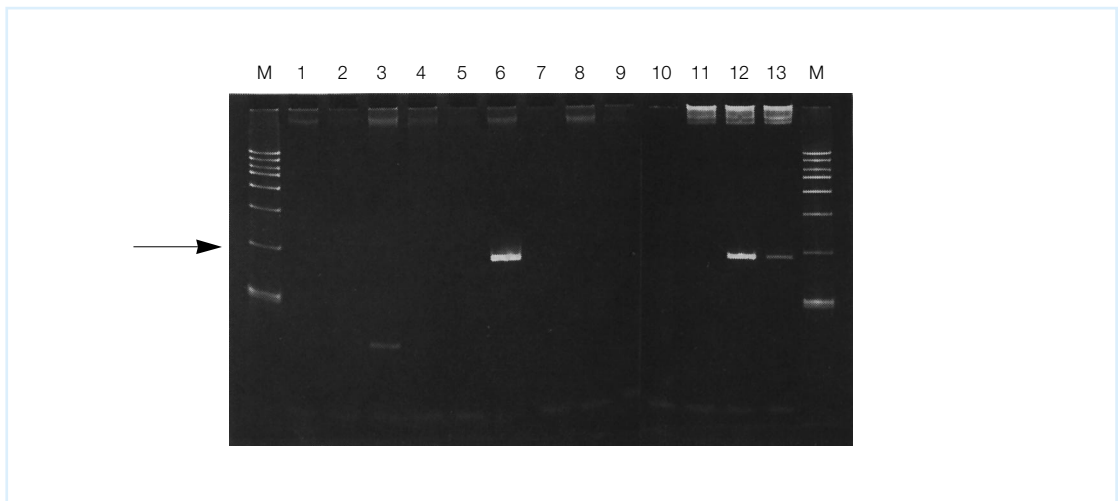


그림 3 체장암 환자의 혈액으로부터 변이 *ras* 유전자의 검출

K-*ras* codon 12의 첫번째 염기가 G에서 C로 변이된 유전자(GGT→QGT)를 검출하는 PCR예를 나타낸다. 그림 1에서 나타낸 primer 1과 primer 2를 조합하여 사용하였다. 화살표는 목적 증폭산물의 크기를 나타낸다. Lane 1에서 lane 10은 환자 혈액의 DNA를 검체로 한 것이며, lane 11은 negative control로 변이가 없는 1 μ g의 human DNA 검체를 사용한 것으로 증폭단편이 검출되지 않았다. 한편, 양성대조에 해당하는 lane 12, 13은 human DNA 1 μ g 중에 CGT 변이형 유전자를 각각 0.1 ng, 0.01 ng 함유하는 검체를 사용한 것으로 모두 단편이 검출되었다.

3. dNTP 농도

통상의 PCR에서는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP는 각각 100~200 μM 의 농도로 사용한다. 이 농도를 2 μM 로 낮추면 H-ras 유전자의 Codon 12에 변이를 갖는 유전자의 비율을 10^{-7} 까지 검출 가능하다는 보고가 있었으나²⁰⁾ 본 실험에서는 이 농도에서 PCR의 증폭효율이 낮아 실험을 재현할 수 없었다. dNTP의 농도가 높으면 primer 3' 말단에 1염기의 변이가 있어도 PCR의 증폭이 일어나기 쉽고, 또한 농도가 너무 낮으면 변이가 없는 primer를 사용해도 증폭효율이 현저하게 저하되기 때문에 50 μM 를 사용하였다¹⁷⁾.

4. PCR 완충액

pH에 의해 어떤 종의 염기쌍의 안정성이 변화한다는 보고가 있다²¹⁾. 그래서 PCR 완충액의 pH를 바꾸어 1염기변이의 인식효율이 변화하는 지를 검토하였지만 확실한 인식효율의 향상을 얻지는 못하였다. 그 외에 K^+ 농도의 조정, glycerol의 첨가 등을 검토하였으나 변화가 없었다.

5. PCR Parameter

DNA polymerase는 double strand DNA가 완전히 상보적인 경우에 비하여 mismatch가 있으면 DNA 신장반응에 보다 긴 시간을 요하고, 이 시간은 mismatch 염기쌍의 종류에 따라 다르다고 보고되어 있다²²⁾. 이 현상을 이용하여 PCR의 신장단계를 생략하고 annealing 단계(동시에 신장단계를 겸한다)의 시간을 5~10초로 단축함으로써 1염기변이의 검출 능력을 향상시킬 수 있었다. 통상의 PCR용 기기로는 PCR의 각 단계의 시간을 짧게 설정해도 다음 단계로 이행할 때의 온도변화에 시간이 걸려 유효하게 증폭되지 않는다. 따라서 고성능의 PCR기기를 사용할 필요가 있다.

▶맺음말

위에서 언급한 방법을 병용함으로써 췌장암에서 확인된 K-ras 유전자의 codon 12의 3 종류의 변이에 대하여 이 유전자의 비율이 10^{-4} ~ 10^{-5} 까지 검출 가능한 방법을 확립하여 췌장암의 유전자 진단에 응용하였다¹⁷⁾(그림 3). 단, primer 3' 말단의 mismatch에 의해 PCR 증폭이 완전히 억제되는 것은 아니고 어디까지나 완전한 상보성이 있는 경우의 증폭효율과의 상대적인 차를 이용하여 검토하고 있다(그림 3). 따라서 항상 positive, negative, control을 음성대조검체를 사용하고 있다. 또한 1염기변이의 검출감

도가 높아짐에 따라 약간의 pH, EDTA 농도 등의 변화가 PCR의 효율에 영향을 미친다. 따라서 본법을 도입할 때에는 사전에 다수의 대조(특히 음성)의 검체를 사용하여 충분히 조건을 설정하여야 한다.



참고문헌

- 1) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-8409 (1989a)
- 2) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Genomics*, **5**, 874-879 (1989b)
- 3) Mashiyama, S., Sekiya, T., Hayashi, K. : *in* Screening of multiple DNA samples for detection of DNA sequence changes by the PCR-SSCP analysis Technique 2, pp. 304-306 (1991)
- 4) Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Analytical Biochem.*, **192**, 82-84 (1991)
- 5) Chehab, F. F., Kan, Y. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9178-9182 (1989)
- 6) Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Wallace, R. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2757-2760 (1989)
- 7) Newton, C. R., Kalsheker, N., Graham, A., Riley, J., Powell, S., Gammack, A., Markham, A. : *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2503-2516 (1989)
- 8) Gibbs, R. A., Nguyen, P. N., Caskey, C. T. : *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2437-2488 (1989)
- 9) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989)
- 10) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Genomics*, **5**, 874-879 (1989)
- 11) Takeda, S., Ichii, S., Nakamura, Y. : *Hum. Mutation*, **2**, 112-117 (1993)
- 12) Hayashi, N., Arakawa, H., Nagase, H., Yanagisawa, A., Kato, Y., Ohta, H., Takano, S., Ogawa, N., Nakamura, Y. : *Cancer Res.*, **54**, 3853-3856 (1994)
- 13) Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R.,

- VerLean de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., Vogelssein, B. : *Nature*, **327**, 293-297 (1987)
- 14) Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Dunitz, J., Arnheim, N., Perucho, M. : *Cell*, **53**, 549-554 (1988)
- 15) Hayashi, N., Ito, I., Yanagisawa, A., Kato, Y., Nakamori, S., Imaoka, S., Watanabe, H., Ogawa, M., Nakamura, Y. : *Lancet*, **345**, 1257-1259 (1995)
- 16) Rolfs, F., Schuller, I., finckh, U., Weber-Rolfs, I., (ed.) : *in PCR : Clinical diagnostics and research*, pp. 149-167, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- 17) Tada, M., Omata, M., Kawai, S., Saisho, H., Ohto, M., Saiki, R. K., Sninsky, J. J. : *Cancer Res.*, **53**, 2472-2474 (1993)
- 18) Kwok, S., Kellog, D. E., McKinney, M., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J. J. : *Nucl. Acids. Res.*, **18**, 999-1005 (1990)
- 19) Chou, Q., Russel, M., Birch, D. E., Raymond, J., Bloch, W. : *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 1717-1723 (1992)
- 20) Ehlen, T., Dubeau, L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 441-447 (1989)
- 21) Boulard, Y., Cognet, J. A. H., Gabarro-Arpa, J., Bret, M. L., Sowers, L. C., Fazakery, G. V. : *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 1933-1941 (1992)
- 22) Huang, M.-M., Arnheim, N., Goodman, M. F. : *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 4567-4573 (1992)

PCR에 의한 특정영역의 변이 검출 (2)

I. PCR-SSOP법

II. GC Clamp를 부가한 DNA Fragment의 DGGE

III. RNase Protection법

IV. PCR-RFLP법

I. PCR-SSOP법

사람의 MHC class 중의 하나인 HLA 항원(human leukocyte antigen)을 code하는 유전자군은 6번 염색체 상에 cluster로 존재하여 고도의 다형성과 연쇄불평형의 존재에 따라 특징지워 진다. 필자 등은 하나 또는 복수의 대립유전자에 특이적인 oligonucleotide probe(Sequence Specific Oligonucleotide Probe: SSOP)를 합성한 후 이것을 nylon filter에 고정한 PCR 산물에 hybridization 함으로써 HLA의 DNA typing을 실시하는 시스템을 개발하였다^{1~3)}. 이 방법은 쉽고 간단한 기술로, 정확하게 다수의 검체를 비교적 저렴한 비용으로 처리할 수 있다는 점이 PCR을 이용하는 다른 1 염기치환 검출법에 비해 가지는 장점이다. PCR-SSOP법(또는 PCR-SSO법)은 기지의 유전적 다형성을 검출하는 데에 우수한 방법으로 다른 분야의 응용도 용이하다. 본 고에서는 PCR-SSOP법의 실제에 대하여 설명한다.

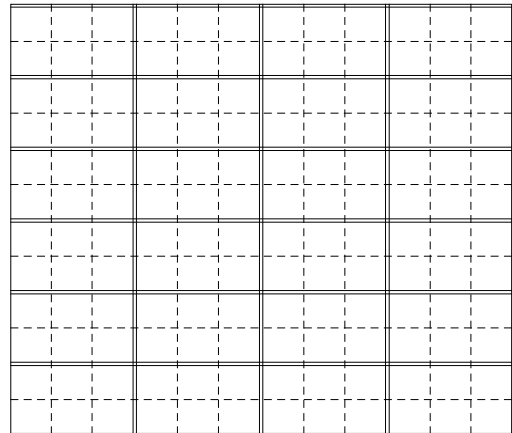
1. 시스템의 설정

(1) PCR에 의한 대상유전자의 증폭

PCR-SSOP법에서는 대상으로 하는 유전자 또는 대립유전자군에 특이적인 유전자를 증폭하는 것이 필수이다. 염기서열이 유사한 다른 기능성 유전자나 거짓유전자가 존재하는 경우에는 primer 서열과 목적으로 하는 유전자 서열의 상동성을 바꿀 필요가 있다. 즉 primer의 3' 측의 1, 2 염기에 mismatch가 있는 유전자는 증폭하기 어렵기 때문에 mismatch 부위를 primer의 3' 측에 설정하여 특이적으로 유전자를 증폭하는 것이다. 유전자간 경합은 annealing 온도가 높고 PCR 완충액의 Mg^{2+} 농도가 낮을수록 특이성은 높아진다. 필자 등은 primer는 18~20염기로, GC 함량은 약 50%(Tm 값 54~60)로 설정하여 55℃의 annealing 온도에서 PCR하는 것을 표준으로 하고 있으나 최근에는 높은 Tm 값(60~80)과 높은 annealing 온도(65℃ 전후)에서 특이적 증폭이 일어나는 경우도 있다. 단, 사용하는 thermal cycler의 종류에 따라 반응조건이 다소 달라지는 경우가 있다. 따라서 특이적 증폭의 반응조건을 설정하기 위해서는 각 연구실마다 예비실험을 충분히 거쳐야 한다. 주형 DNA로는 genome DNA나 cDNA 어떤 것도 상관없다.

필자 등은 최대 약 1,200 bp 까지 PCR 산물을 얻은 경험에 있다. 또 다수 검체의 반응성을 검토하는 경우, 필터에

dot되는 PCR 산물의 양이 극단으로 균일하지 않으면 판정이 곤란해지는 경우가 있으므로 안정한 PCR의 반응조건이 바람직하다.



probe의 번호를 기재한다

그림 1 Dot용으로 인쇄된 nylon membrane

(2) SSOP의 선택

종래의 PCR-SSOP법에서는 1염기의 차이를 인식하기 위하여 각 probe마다 다른 온도나 염농도 등의 hybridization 조건을 설정하였다. 필자 등은 tetra methyl ammonium(TMAC)을 사용함으로써 SSOP의 염기 길이는 18염기로 통일하고 hybridization 온도는 54~55℃, 세정온도는 58~59℃로 하여 한꺼번에 hybridization을 실시하였다. SSOP를 위한 염기서열을 선택할 때는 다음의 두가지 사항을 주의하여야 한다. 첫째, 다른 대립유전자와의 mismatch 부위를 가능한 한 SSOP의 중심 가까이에 설정하는 것이다. 18염기의 SSOP의 경우 양단의 3염기를 mismatch 부위로 설정하는 것은 절대 피하여야 한다. 둘째, SSOP 내에서의 self-annealing에 의한 2차구조의 형성이 5' 말단에서 일어나지 않도록 하는 것이다. 왜냐하면 polynucleotide kinase는 5' 돌출말단에서의 ³²P 전이 효율이 높기 때문이다. 예를 들어 SSOP의 5' 말단 2염기(예를 들면 GA)에 대응하는 염기서열(CT)이 3' 측에서 존재하지 않도록 설정한다. SSOP를 설정하는 방향은 sense 방향이나, antisense 방향, 어느 쪽도 상관없으므로 이상의 조건을 충족할 수 있는 방향으로 설정하는 것이 바람직하다.

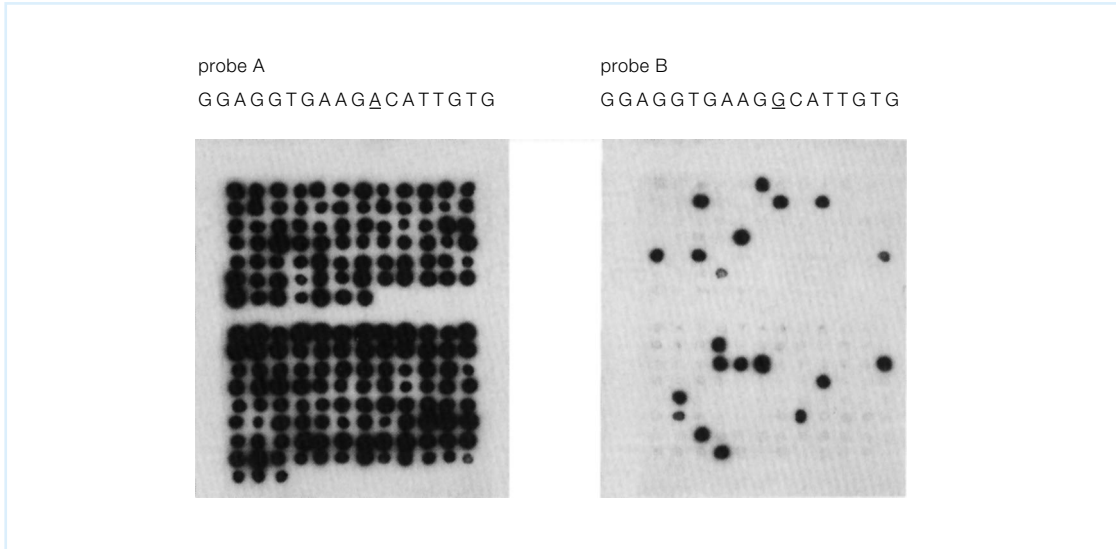


그림 2 Hybridization의 일례

Probe A는 모든 검체가 hybridize한다. 한편, total 21 검체가 probe B에 hybridize하여 이들의 검체는 대립유전자 A와 B의 이형접합체임을 알 수 있다.

2. 실험법

(1) PCR 산물의 Filter에 부착

Pore size 0.45 μm 의 nylon membrane(southern transfer에 사용하는 것과 동일)을 SSOP의 검체수에 따라 준비하여 10 \times SSPE(1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Na_2HPO_4 , pH7.4)에 10분간 적신 후 30분 이상 실온에서 건조한다. Filter 위에 PCR 산물을 1~2 μl (25~50 ng) 떨어뜨린 후 실온에서 30분 이상 건조한다. 그림 1에 나타난 것처럼 dot printer로 membrane에 6 mm의 사각형을 인쇄하여 1~2 μl 의 0.5 \times 염색액을 PCR 산물과 혼합하여 떨어뜨렸다. 이어서 0.4 N NaOH에 5분간 적신 후(급하게 적시지 않도록 주의한다) 10 \times SSPE에 10분간 적신다. 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 건조하여(baking) DNA를 membrane에 완전히 고정한다. 실온에서 한나절 이상 건조하여도 무방하므로 완전히 건조하는 것이 바람직하다.

(2) SSOP의 표식

SSOP(5 pmol)를 50 mM Tris-HCl(pH7.6), 10 mM MgCl_2 , 5 mM DDT 속에서 20 pmol(2220 kBq) [γ - ^{32}P] ATP와 혼합하고, 20 unit의 T4 polynucleotide kinase를 첨가하여(최종 반응액량은 25 μl 로 한다) 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30

분~1시간 반응한다. 이어서 75 μl 의 20 mM EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 반응을 정지한 다음 probe로 사용한다.

(3) Hybridization과 세정

Membrane을 hybridization 용액(0.1% SDS, 5 \times Denhardt's 용액, 2 mM EDTA(pH 8.0), 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl(pH8.0), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 변성 salmon sperm DNA)에 담긴 plastic bag 속에 넣어 54~55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 이상 정치한다(prehybridization). 조제한 probe(total 100 μl)를 hybridization 용액에 첨가한 다음 54~55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1~3시간 진탕하면서 반응한다. Bag에서 membrane을 꺼내고 실온에서 2 \times SSPE, 0.1% SDS로 10분간 2회, TMAC 용액(0.1% SDS, 2 mM EDTA, 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl(pH8.0))으로 10분간 1회, 58~59 $^{\circ}\text{C}$ 에서 TMAC 용액으로 10분간 2회 세정한다. 마지막으로 2 \times SSPE로 5분간 세정한 뒤 실온에서 30분간 건조한다. 통상 autoradiography는 실온에서 1시간~한나절 실시한다(그림 2). DNA를 고정한 membrane은 dehybridization 함으로써 반복하여 사용할 수 있다. Dehybridization은 사용한 membrane을 0.4 N NaOH 속에 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 정치한 후 dehybridization 용액(0.2 M Tris/HCl(pH8.0), 0.1 \times SSPE, 0.1% SDS)에 20분간 정치함으로써 실시된다.

▶ 맺음말

PCR-SSOP법의 시스템 설정과 실제에 대하여 개설하였다. 필자 등은 SSOP의 표식에는 ^{32}P 에 의한 방사선표식을 주로 이용하지만, 비방사선표식에 의한 검출 방법도 개발되어 있다. 가장 빈번하게 이용하는 것은 biotin-dUTP를 이용하여 SSOP를 표식하여 avidin-ALP로 검출하는 방법이다. 그러나 방사선표식에 비하여 cross-hybridization에 의한 background가 높아서 문제가 되는 경우가 많아, SSOP의 염기 길이나 서열을 신중히 검토할 필요가 있다. 또한 다수 검체의 다수 SSOP에 대한 반응성을 검토해야 하는 HLA의 DNA typing에서는 SSOP를 membrane이나 microtiter plate에 고정해 두고 PCR 산물을 비방사성으로 표식한 후 hybridize하는 PCR-SSOP법의 개량법[PCR-RD(Reverse Dot)법, PCR-MPH (microtiter plate법)]도 개발되었다.

이들 방법은 hybridization 및 결과의 해석이 모두 기계화되어 매우 신속하고 간단하게 typing할 수 있다.

II. GC Cramp를 부가한 DNA Fragment의 DGGE

변성제 농도 기울기 gel 전기영동법(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE)은 double strand DNA 상의 1염기 치환 및 수십 염기쌍까지의 삽입, 결실 등의 작은 변이를 높은 효율로 검출하는 방법이다^{4, 5)}. 해석하고자 하는 DNA 서열(target)을 PCR로 증폭하여 DGGE를 실시하는 PCR-DGGE법⁶⁻⁸⁾에서는 ethidium bromide 염색으로 DNA 밴드를 검출하므로 방사성 동위원소를 필요로 하지 않는다. 또한 target을 증폭할 때 말단에 GC rich한 염기서열(GC cramp)을 부가할 수 있으므로 변이의 검출 확률은 이론적으로 100%가 된다⁹⁾. mRNA상의 변이는 mRNA를 역전사효소에 의하여 cDNA로 변환한 후 PCR-DGGE를 실시하여 검출한다. 재현성이 매우 높으며 최적 조건으로 설정하면 99% 이상의 확률로 양호한 영동패턴을 얻을 수 있다. 이 방법은 통상의 실험실 내에서도 간편하게 실시할 수 있는, 효율이 좋은 screening법이다¹⁰⁾.

한편 염기서열에 대한 정보가 없는 DNA상의 변이¹¹⁾나 methyl화의 정보¹²⁾가 필요한 때에는 genome DNA를 약 500 염기쌍의 fragment로 절단한 후 DGGE를 실시하는 방법¹³⁾(gDGGE)도 있다.

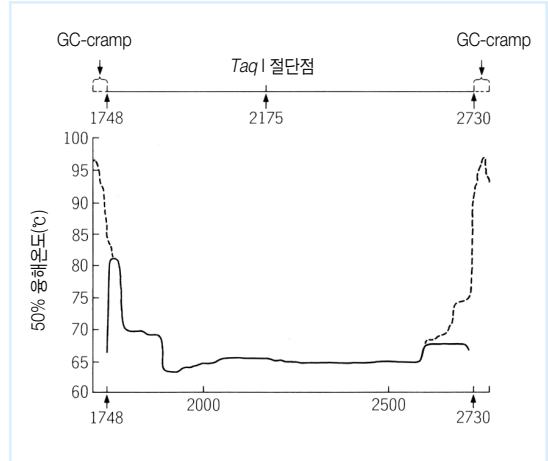


그림 1 Human 혈액응고 제 IX인자 유전자(F9) 단편의 용해지도

실선은 F9의 GenBank 염기서열 번호 1748-2730간의 DNA fragment(938 bp)의 용해지도. 이 fragment의 5' 측, 3' 측의 쌍방에 40 bp의 GC cramp⁹⁾를 부가하여 1063 bp의 서열로 한 경우의 용해지도는 점선으로 표시한 형태로 변화한다. 용해지도상에 표시한 실선은 서열번호 1748-2730간의 DNA fragment를 나타내며 그 양단의 점선은 GC fragment를 나타낸다. 2175 위치는 TaqI 절단점이다.

1. 원리¹⁴⁾

Double strand DNA는 온도상승에 따라 2중 나선구조가 부분 용해를 거쳐 완전히 분리된 random coil 형태의 single strand로 전이한다. 연속한 20~300개의 염기쌍이 비교적 좁은 온도범위에서 2중나선에서 random coil로 변환하는 경우 이를 domain이라 하는데 그 형성과 용해온도(Tm)는 염기서열에 의존한다. DNA의 염기서열에 대응하는 Tm을 blot한 것이 용해지도(melting map)이다.

그림 1은 Lerman 등의 컴퓨터 프로그램¹⁵⁾을 이용하여 작성한 것으로, 각 염기쌍이 2중 나선구조와 random coil 구조 사이에서 50:50의 평형을 취하는 온도를 나타내고 있다. 이 용해지도의 모양으로부터 변이분리의 가능성을 예측할 수 있다. DNA 분자의 구조변화는 polyacrylamide gel 전기영동에서 DNA 분자의 이동도로 나타난다. 즉, 일부에서는 2중나선구조를 취하고 일부에서는 single strand로 해리된 DNA 분자의 이동도는 완전한 2중나선 분자나 single strand DNA에 비하여 아주 낮다. 열에 대한 안정성과 변성제에 대한 불안정성은 거의 동등하다. Lerman 등은 이 원리를 이용하여 변성제(urea와 formamide)의 농도기울기를 준 polyacrylamide gel 속에 DNA fragment를 전기영동하는 DGGE법을 개발하였

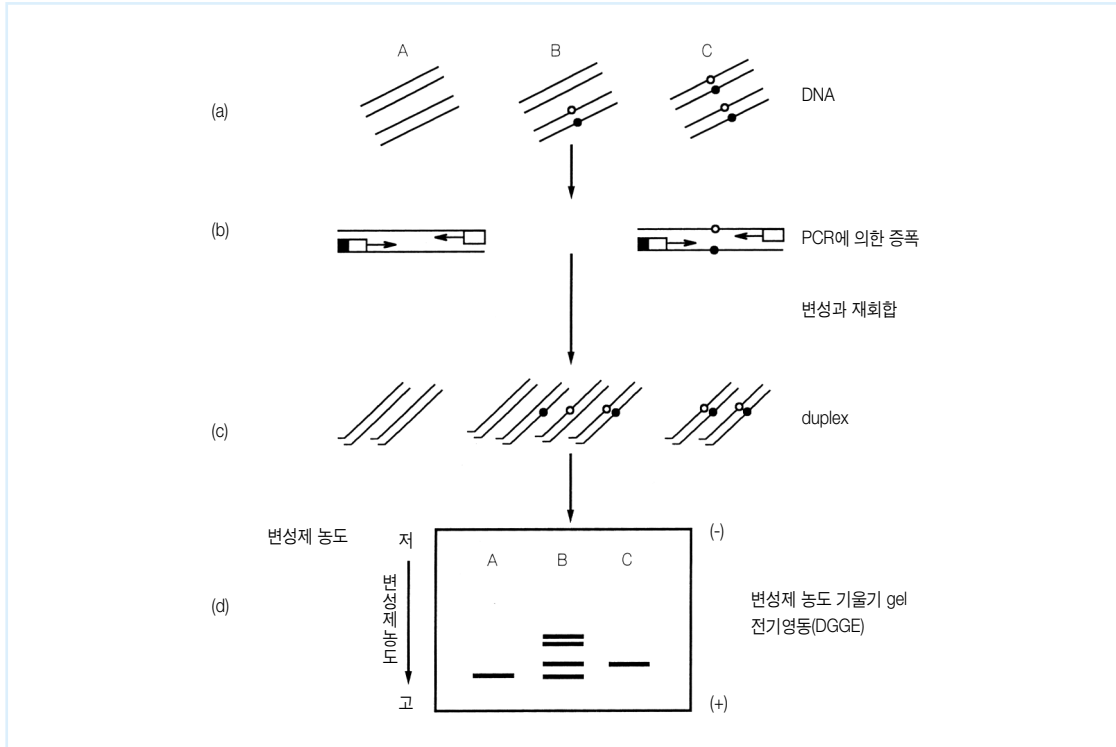


그림 2 PCR 증폭 DNA fragment의 DGGE(PCR-DGGE)의 모식도

(a) A: 정상형 동형접합 DNA, B: 정상형 및 변이형의 이형접합 DNA, C: 변이형 동형접합 DNA, ●, ○: DNA상의 변이(치환, 결실, 삽입 등), (b) ■□→: 5' 측 primer(흑색부분은 GC cramp를 나타낸다, ←□: 3' 측 primer, (C) 정상형 homoduplex, 두 종류의 heteroduplex, 변이형 homoduplex, 흰색부분은 GC cramp를 나타낸다, (d) 평행 DGGE 패턴의 모식도; (-)(+)는 음극, 양극을, gel의 좌측화살표는 변성제 농도의 증가방향을 나타낸다.

다^{4,5)}. 단일 염기치환 등의 작은 변이는 변이를 포함하는 domain의 Tm을 상승 또는 하강시킨다. Tm이 낮은 염기서열을 갖는 fragment는 Tm이 높은 fragment에 비하여 낮은 변성제 농도(보다 원점에 가까운 위치)에서 부분 해리되고 이동도가 현저하게 감소하므로 변이의 유무에 따라 DNA fragment를 서로 분리할 수 있다. 그러나 Tm이 가장 높은 domain 중에 변이가 존재하면, 용해 후 생기는 single strand DNA의 이동도에는 변이의 유무에 따라 차이가 생기지 않으므로 양자가 분리되지 않는다. Myers 등은 GC cramp를 target 서열에 연결하면 이 부분이 Tm이 가장 높은 domain이 됨을 이용하여 이같은 문제점을 극복하였다⁶⁻⁹⁾.

그림 2에 PCR-DGGE의 개략을 모식도로 나타내었다. 정상형 동형접합(A) 및 변이형 동형접합(C)의 DNA로부터 증폭된 fragment는 각각 이동도가 다른 homoduplex가 된다. 한편 정상형 및 변이형의 이형접합 DNA(B)의 경우에는 정상형과 변이형의 두 종류의 homoduplex만이 아니

라 PCR 도중에 두 종류의 heteroduplex도 생성한다. 이 때문에 영동조건이 적당한 경우에는 모두 4개의 밴드가 관찰된다. Mismatch가 존재하는 heteroduplex는 불안정하며 homoduplex의 밴드보다 항상 이동도가 낮다. 따라서 homoduplex끼리는 분리하지 않는 조건하에서도 검출이 가능하여 변이 검출효율을 향상시킬 수 있는 잇점이 있다.

2. GC Cramp를 부가한 DNA Fragment의 DGGE

(1) PCR

5'측에 GC cramp를 부가한 primer를 이용하여 PCR을 실시한다. 필자 등도 40 bp의 cramp⁹⁾를 사용하였으나¹⁰⁾ Abrams 등이 29 bp의 cramp로 성공적인 결과를 얻은 이후¹⁶⁾ 현재는 5'-GCCCGCCGTCGCCGACCGCCCGCACGCCG-3'을 사용하고 있다.

(2) 평행 DGGE와 수직 DGGE

변성제의 농도기울기의 방향과 전기영동의 방향을 평행으

로 하는 평행 DGGE(parallel DGGE)는 다수의 시료를 동시에 검사할 수 있으므로 screening에 적합하다. 한편 서로 수직이 되는 수직 DGGE(perpendicular DGGE)를 이용하면 target이 용해되기 시작하는 변성제의 농도와 2종류 이상의 duplex가 분리되는 변성제의 농도범위에 관한 정보를 얻을 수 있다¹⁷⁾. 필자 등은 이러한 정보도 이용하여 수직 DGGE의 조건을 설정하고 있다. 수직 DGGE는 최적조건 설정을 위한 예비실험이 필요없으므로 소수 시료 중의 변이의 유무를 신속하게 검출하는데 좋은 방법이다.

(3) PCR-DGGE법의 장치 및 영동법¹⁸⁾

영동장치는 Fisher 등⁴⁾의 문헌을 참고로 개조한 특수 주문품이다. 그외의 장치(gradient maker, 항온수조, power supply, pelister pump)는 모두 시판품을 사용할 수 있다. TAE buffer(40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, acetic acid로 pH7.4로 조정)중 acrylamide의 총 농도는 6.5% 또는 12%(T=6.5% 또는 12%)로 가교도는 C=2.6%(acrylamide/ bisacrylamide=30/0.8)로 하여 변성제 농도에 직선 기울기가 되도록 만든다. 40%(v/v) formamide, 7 M urea를 함유하는 용액을 100%의 변성제 농도로 정의한다.

전기영동은 영동조를 60℃의 항온조에 부착하여 가온한 양극액에 gel판 전체가 잠기도록 함으로써 gel의 온도를 60℃로 유지한다. Gel 상부의 음극액과 양극액을 pelister pump로 순환시켜 완충액의 pH를 유지시킨다. 150 V에서 17시간동안 영동한 후 gel을 ethidium bromide로 염색한다.

(4) 평행 DGGE의 영동조건의 설정

변이의 검출여부는 target의 성질(길이, domain의 수와 T_m)과 전기영동의 조건에 따라 결정된다. 필자 등의 경험으로는 350~700 bp의 fragment 내의 변이가 가장 높은 검출률을 나타내었다. 또한 용해지도에서 5'이나 3'측의 어느 한쪽의 용점이 높고, L자형 또는 역 L자형을 나타내는 경우에는 sharp한 밴드를 얻을 수 있어, 아주 작은 이동도의 차이도 검출할 수 있다. GC cramp를 target에 도입하는 경우에도 이점에 유의해야 한다. 그림 1의 fragment와 같이 중앙 domain의 T_m이 낮은 U자형의 경우는 밴드의 폭이 커져 변이의 검출이 곤란해진다. 그러나 이 fragment를 중앙에서 절단하면 생기는 두 개의 약 500 bp 밴드가 각각 L자형과 역 L자형의 용해지도를 나타낸다. 실제로 필자 등은 이들 두 개의 각 fragment에 의존하

는 C→T 변이를 검출하였다¹⁰⁾(그림 3). 더구나 이 방법은 screening의 효율상승과 비용절감에도 도움이 된다. 필자 등은 영동조건을 아래와 같이 결정하였다. 즉, 2~3 kb target의 양단에 GC cramp를 도입하도록 PCR한 후에 수 종류의 제한효소로 절단한다¹⁰⁾. 가능한 한 다수의 fragment가 변이검출에 적합한 용해지도를 나타낼 수 있도록 제한효소를 조합한다. 이 fragment를 4종류의 gel(T=12%, 6.5%와 변성제 농도 0~100%, 20~60%의 조합)로 영동하여 최적 영동조건을 결정한다. 수직 DGGE를 실시하여 sigmoid curve 중심점의 변성제 농도가 ±20%인 gel로 영동하는 것도 좋은 방법이다⁵⁾.

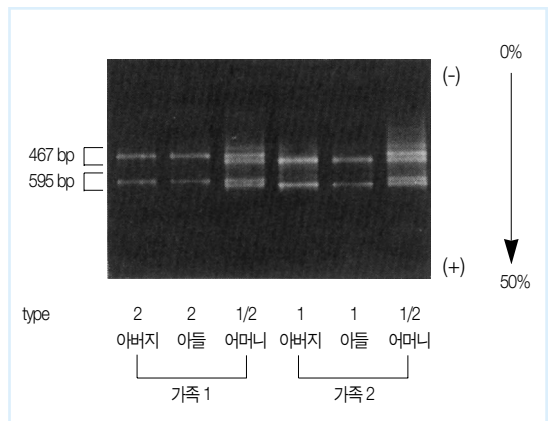


그림 3 GC cramp를 부가한 human 혈액응고 제 IX인자 유전자(F9) fragment의 DGGE 상

그림 1의 용해지도에 나타낸 1,063 bp의 DNA fragment를 두 개로 절단하여 얻은 DGGE상이다. F9의 983 bp fragment(GenBank 염기서열 번호 1748-2730 사이)의 양단에 40 bp의 GC fragment*가 부가되도록 PCR하여 생성된 1,063 bp fragment를 Taq I을 사용하여 2개의 fragment(467 bp와 595 bp)로 절단한 후 DGGE를 실시하였다(T=12%, 농도 기울기 0~50%). F9는 X 염색체 상의 유전자이다. 두 개의 fragment 중의 변이는 서로 연쇄하고¹⁹⁾ 있어, 두 개의 밴드가 set로서 빠른 이동도를 갖는 경우를 type 1, 그와 반대로 set로서 낮은 경우를 type 2로 명명하였다. 가족 1의 아버지와 아들은 type 2, 가족 2의 아버지와 아들은 type 1의 hemizygote이며 두 가족의 어머니는 모두 type 1과 type 2의 heterozygote(1/2로 나타냄)이다. Sequence분석 결과, type 1에서는 1,780 위치 및 2,268 위치가 C인 것에 비하여 type 2에서는 두 자리 모두 T임을 확인하였다.

▶맺음말

DGGE법은 DNA 분자의 안정성이 염기서열에 따라 다르며 불과 1염기의 차이가 안정성의 변화로서 전기영동의 이동도로 반영되는 것을 이용한 변이검출법이다. PCR법에 의해 GC cramp를 target에 도입할 수 있게 되어 검출확률이 높고 간편하게 되었다. 같은 원리를 이용한 것으로는 온도 기울기를 갖는 gel 상에서 영동하는 온도기울기 gel 전기영동법(TGGE)과 항온도 변성제 gel 전기영동법

(CDGE)이 있다. 후자는 기지의 변이를 검출하기 위한 최적 변성제 농도에서 다수의 검체를 screening하여 그 변이의 유무를 검사하는 방법이다.

III. RNase Protection법

의학이 발달함에 따라 보다 많은 질환의 원인을 유전자 수준에서 밝히는 시대가 도래하였다. 후보유전자가 어떤 질환의 원인 유전자인지 확인하려면 몇가지 사항을 증명할 필요가 있다. 예를 들면 유전자 이상에 의하여 유전자산물에 중대한 변화가 생겨 정상적인 기능을 발휘할 수 없게 되고, 이 유전자 이상이 그 질환에 특이적이라는 것을 증명하는 것 등이다. 유전자 이상을 확인하려면 염기서열을 조사할 필요가 있는데, 후보유전자의 전염기서열을 모든 환자를 대상으로 조사하는 것은 상당한 시간과 노력이 필요하기 때문에 일반적으로는 1차 screening을 먼저 실시한다. 1차 screening 방법 중 현재 자주 이용되는 것으로는 RNase protection법^{19, 20)}이 있고 이외에도 SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)법, DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)법, IVSP(*in vitro* Synthesized Protein)법 등이 있다. 이들 방법에는 각각 장단점이 있다. RNase protection법의 장점으로는 PCR의 인위적인 영향을 거의 받지 않고, 감도가 좋다는 점을 들 수 있다. 반면에 시간이 걸리고 모든 유전자의 이상을 검출할 수 없다는(효율 약 70%)점 등의 단점도 있다. RNase protection법으로 mRNA의 정보도 얻을 수 있지만 1염기의 차이를 검출하는 방법으로서의 RNase protection법에 대하여 설명한다.

1. RNase protection법의 원리

RNase protection법의 원리를 그림 1에 나타내었고, 현재 널리 이용되고 있는 PCR법과 병용한 것에 대하여 설명한다. 또 표 1에는 RNase protection법에서 사용하는 시약을 정리하였다. 우선 조사하고자 하는 영역에 대응하는 정상 염기서열을 갖는 RNA probe를 제작하고, 이 probe와 조사하고자 하는 핵산(일반적으로는 환자의 혈액이나 암조직 등에서 추출한 DNA나 RNA를 PCR로 증폭한 산물)을 hybridize한다. 만약 염기치환 등이 존재하면 그림 1에 나타낸 바와 같이 mismatch가 생기므로 RNase를 작용시키면 mismatch 부분을 절단하기 때문에 전기영동에 의하여 extra 밴드로서 검출된다.

표 1 RNase protection법에 사용하는 시약류

| | | |
|---|----|----|
| (A) RNase protection 반응 buffer | | |
| (1) Hybridization용 buffer(최종농도) | | |
| 40 mM Pipes (pH 6.4) | | |
| 1 mM EDTA | | |
| 0.4 M NaCl | | |
| 80% Formamide | | |
| (2) RNase A buffer(최종농도) | | |
| 0.2 M NaCl | | |
| 0.1 M LiCl | | |
| 0.02 M Tris(pH 7.5) | | |
| 1 mM EDTA | | |
| (B) RNA probe 제작용 시약류 | | |
| 주형 DNA(200~400 ng) | x | μl |
| 5 X Transcription buffer | 4 | μl |
| 100 mM DTT(dithiothreitol) | 2 | μl |
| RNase Inhibitor(40 U/μl) | 1 | μl |
| 10 mM ATP | 1 | μl |
| 10 mM GTP | 1 | μl |
| 10 mM CTP | 1 | μl |
| 1 mM UTP | 1 | μl |
| [α - ³² P]UTP(800 Ci/m mole) | 4 | μl |
| (T3 또는 T7) RNA polymerase | 1 | μl |
| DEPC 처리수 | y | μl |
| Total | 20 | μl |

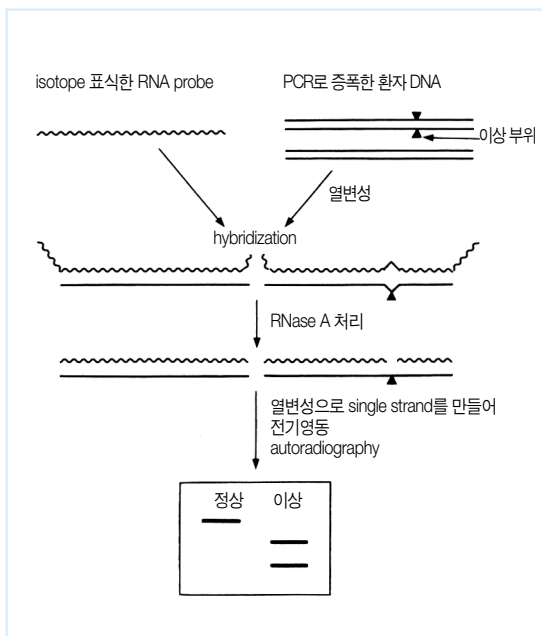


그림 1 RNase protection법의 원리

2. RNA Protection법의 실제

(1) Probe의 제작

먼저 정상 염기서열을 plasmid에 cloning한다. 이 때 cloning 부위의 양측에 clone화 한 plasmid를 한 부위만 절단하는 제한효소 인식부위와 RNA polymerase의 promoter 서열이 존재하도록 한다. 필자 등은 통상 pBluescript II SK(-)를 이용한다(이 경우 cloning 부위는 polylinker 내부에 있으며, 그 양측에 T3, T7 promoter 서열이 있다). 그림 2에 T3 promoter측으로부터 probe를 제작한 예를 나타내었는데 T7 promoter측의 probe도 동일한 방법으로 제작할 수 있다. Probe가 만들어지면 RNase free-DNase I을 이용하여 plasmid DNA를 분해해 둔다.

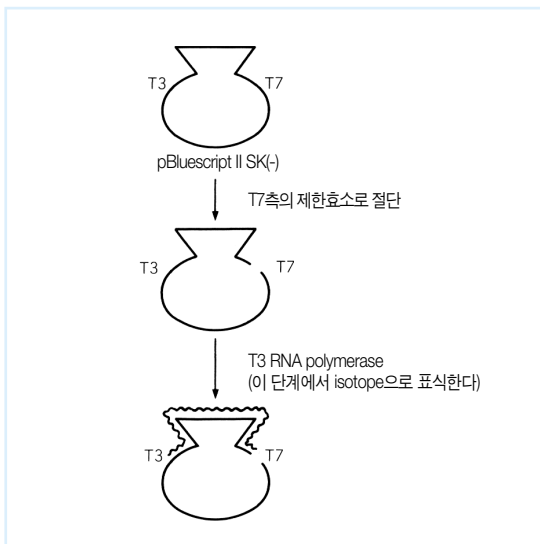


그림 2 RNA probe의 제작 (T3 probe의 경우)

(2) PCR

조사하고자 하는 영역의 DNA 또는 RNA를 PCR로 증폭한다. 필자 등의 경험으로는 약 400 bp의 PCR 산물까지는 높은 효율로 염기서열의 이상을 검출하였다. PCR을 실시할 때 다소의 인위적인 영향이 존재하여도 RNA probe와는 hybridize하지 않으므로 목적의 영역이 충분히 증폭되었으면 진행해도 된다. PCR이 완료되면 산물을 전기영동으로 확인한 후, 이중 1 μ l를 취하여 RNase protection 반응을 실시한다.

(3) RNase Protection 반응

PCR 산물 1 μ l와 RNA probe를 buffer 속에서 50℃, 2시간 이상 hybridization 한다. 30~60분간 RNase A로 처리한 다음 proteinase K, phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 처리하고 변성 polyacrylamide gel로 전기영동하여 autoradiography로 이상의 유무를 조사한다. 그림 3에 실험을 나타내었다. RNase A는 모든 mismatch를 검출하지는 못하므로 T3과 T7측으로부터의 양방향 RNase protection 반응을 실시함으로써 검출효율을 높일 수 있다. 실제로 그림 3의 A(T3측)에서는 이상이 검출되었으나 B(T7측)에서는 이상이 검출되지 않았다.

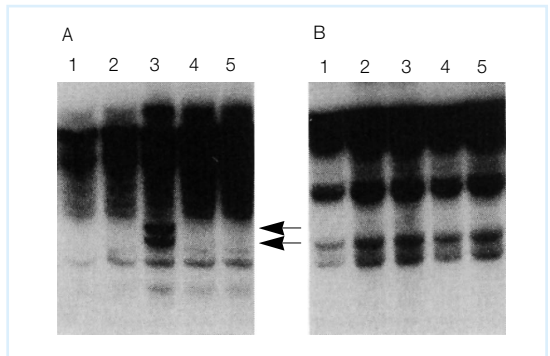


그림 3

(A)는 T3측, (B)는 T7측으로부터 RNA probe로 반응한 것이다. T3측에서는 lane 3의 시료에 이상 밴드(화살표로 표시)가 확인되었다.

(4) 염기서열의 결정

RNase protection 반응에서 이상 밴드가 검출된 경우에는 염기서열을 조사하여 의미가 있는 이상인지의 여부를 판정한다. 그림 3에서 관찰된 이상 밴드(lane 3)의 염기서열을 그림 4에 나타내었다.

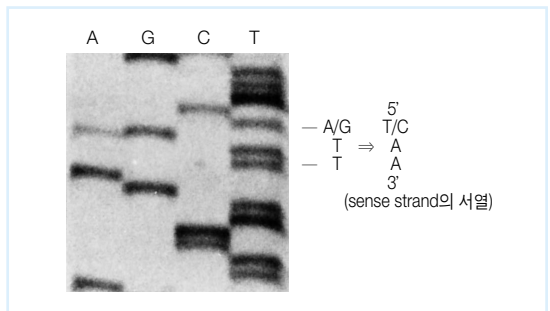


그림 4 Lane 3 시료의 염기서열

Antisense의 염기서열을 나타낸 것인데 정상인 sense strand에서의 CAA 부위가 TAA (nonsense mutation)로 존재함을 확인하였다(Horii, A., et al. : *Cancer Res.*, **52**, 3231-3233 (1992)에서 개번).

▶ 맺음말

본 고에서는 RNase protection법의 개략에 대하여 설명하였다. 이 방법은 다소 시간이 걸리지만 감도가 양호하며 가장 큰 특징은 약간의 PCR 인위적인 영향이 있어도 문제가 되지 않는다는 점이다. 이외에도 각종 유전자이상의 검출 방법이 있으므로 각 상황에 따라 적절한 방법으로 연구를 진행하는 것이 중요하다.

IV. PCR-RFLP법

RFLP란 특정 제한효소로 DNA를 절단하면 DNA 서열에 개체간의 차이가 존재하므로 이에 따라 제한효소 소화단편의 길이가 달라지는 성질을 의미하는 것이다. RFLP marker는 linkage 해석으로부터 유전성 질환의 원인유전자 동정, 종양에서의 이형접합성의 소실(Loss Of Heterozygosity: LOH)의 검출에 의한 암억제유전자의 존재영역의 한정 등에 이르기까지 폭넓게 이용되고 있다.

최근 염색체상의 유전자 위치에 관한 정보를 근거로 원인 유전자를 cloning하는 방법(positional cloning)에 의해 유전성질환의 원인유전자나 각종 종양의 암억제유전자의 존재부위가 해명되고 있다. 이것이 가능하게 된 가장 큰 이유는 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) marker를 비롯한 다형성 DNA marker를 사용하여 부모 유래의 상동염색체 2개를 용이하게 구별할 수 있게 되었기 때문이다. 그 결과 human genome에 있어서의 유전적 염색체지도의 작성, 유전성질환의 원인유전자 염색체의 mapping 그리고 종양에서의 이상(결실, 삽입, 변이 등)의 검색이 가능하게 되었다. 현재 각종 암에 대한 암억제유전자의 국제 부위 검색은 이형 접합성의 소실을 지표로 널리 실시되고 있다. 최근 비약적인 발전을 거듭하고 있는 PCR법과 병용함으로써 목적으로 하는 영역을 증폭한 후에 점돌연변이의 유무를 검출하는 등 암유전자, 암억제유전자의 해석에도 도움이 되고 있다.

본 고에서는 PCR법과 병용한 RFLP의 증폭의 응용으로서 암유전자의 점돌연변이의 검출법에 대한 개략을 중심으로 설명한다.

1. Linkage 해석과 RFLP Marker

Linkage 해석으로 유전성 질환의 원인유전자가 존재하는 영역을 동정하기 위해서는 재조합의 유무를 판정하고 염색체상의 지표가 되는 marker가 필요한데, 최초로 널리 이

용된 것이 RFLP marker이다. RFLP란 개체간에 다양하게 존재하는 염기서열을 유전적 표식으로 하는 다형성 DNA marker의 일종으로 DNA 서열에 개체차가 존재하기 때문에 제한효소로 절단하는 경우 개체에 따라 DNA 단편의 길이가 달라짐을 이용하는 방법이다(그림 1). 특정 RFLP marker가 linkage 해석으로 그 질환과의 관련성이

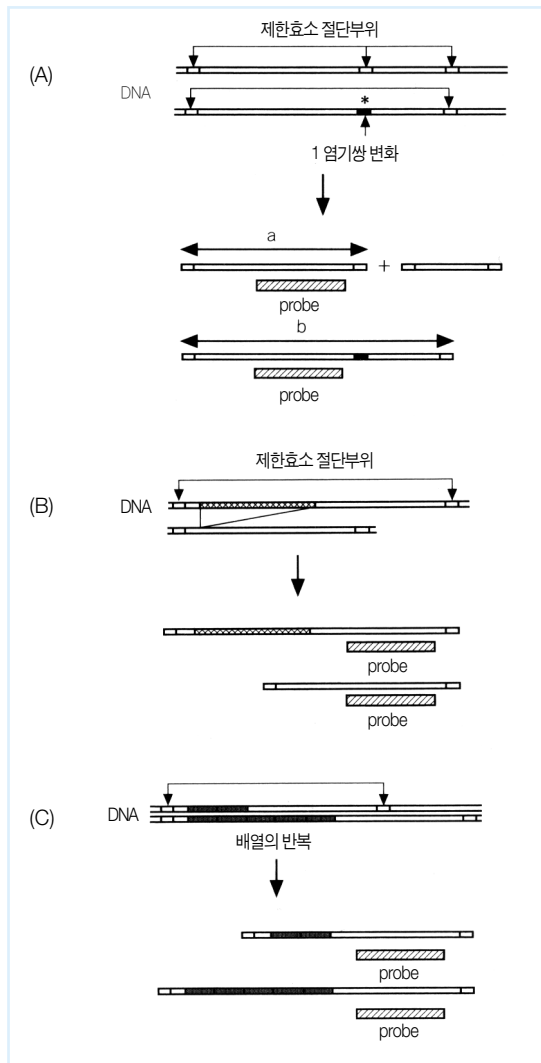


그림 1 염기서열의 변화로 발생하는 RFLP

(A) 제한효소에 의해 그림에 표시한 세 부위에서 절단되는 염색체와 염기서열의 차이로 인해 *부위가 절단되지 않는 염색체에서 RFLP를 검출하는 probe(zzzz)에 의해 길이가 다른(a와 b) DNA 단편이 검출된다. (B) Insertion/deletion polymorphism의 예이다. 정상 염색체에서도 insertion(삽입) 또는 deletion(결실)(xxxx로 표시한 부분)이 존재하기 때문에 검출되는 DNA 단편의 길이가 다르다. (C) 일부에 반복 서열이 존재하여 RFLP probe로 검출되는 DNA 단편의 길이에 변화가 생기는 경우가 있다. 염색체상의 여러 위치에 존재하는 반복 횟수는 염색체 간에 큰 차이를 보이는데 이를 microsatellite 또는 VNTR이라 부른다.

밝혀졌다면, 이것은 그 질환의 원인유전자가 연관되어 있는 RFLP marker의 근방에 위치함을 의미하는 것이다. 그러나 RFLP marker는 이형접합 확률이 반드시 높지는 않으며 또한 지금까지 분리된 marker가 human genome 상에서 높은 빈도로 분포하지 않으므로 현재는 human genome 상에서 이보다 더 높은 빈도로 존재하는 microsatellite marker를 많이 사용하며 이미 전염색체에 이르는 상세한 연관지도가 완성되어 있다²¹⁾. Microsatellite marker는 이형접합의 확률이 높고 primer의 설정에 따라 PCR 산물의 크기를 작게 조절할 수 있으며, 또 paraffin block 유래의 DNA도 분석할 수 있다는 장점이 있어 linkage 해석 및 allele type 해석에 매우 유용한 것이다.

2. RFLP의 검출

RFLP는 개체간의 염기서열이 다름에 따라 제한효소 단편의 길이에 차이가 생기는 것인데, 이러한 차이를 검출할 때

에는 southern hybridization을 이용하는 경우와 PCR법을 이용하는 경우가 있다. PCR법에 의한 검출은 특정 marker를 포함하는 영역을 PCR법으로 증폭한 후에 그 산물을 제한효소로 절단하여 agarose 또는 polyacrylamide gel로 전기영동한 뒤 gel을 ethidium bromide로 염색하는 것만으로 RFLP를 검출하는 방법이다. 이 경우 염기서열의 정보를 미리 알고 있어야 하며 PCR로 증폭가능한 길이의 범위 내에서만 이용할 수 있다는 단점이 있지만, 수 bp와 같은 작은 단편의 길이 차도 검출할 수 있고 방사선 동위원소를 사용하지 않아도 단시간에 검출할 수 있다는 점 등 많은 장점이 있다.

3. PCR-RFLP법에 의한 점돌연변이의 검출

제한효소의 절단부위에서 1염기만 치환하여도 RFLP가 생성되는 원리를 이용하여 기지의 염기서열에서의 점돌연변이의 확인에도 응용할 수 있다.

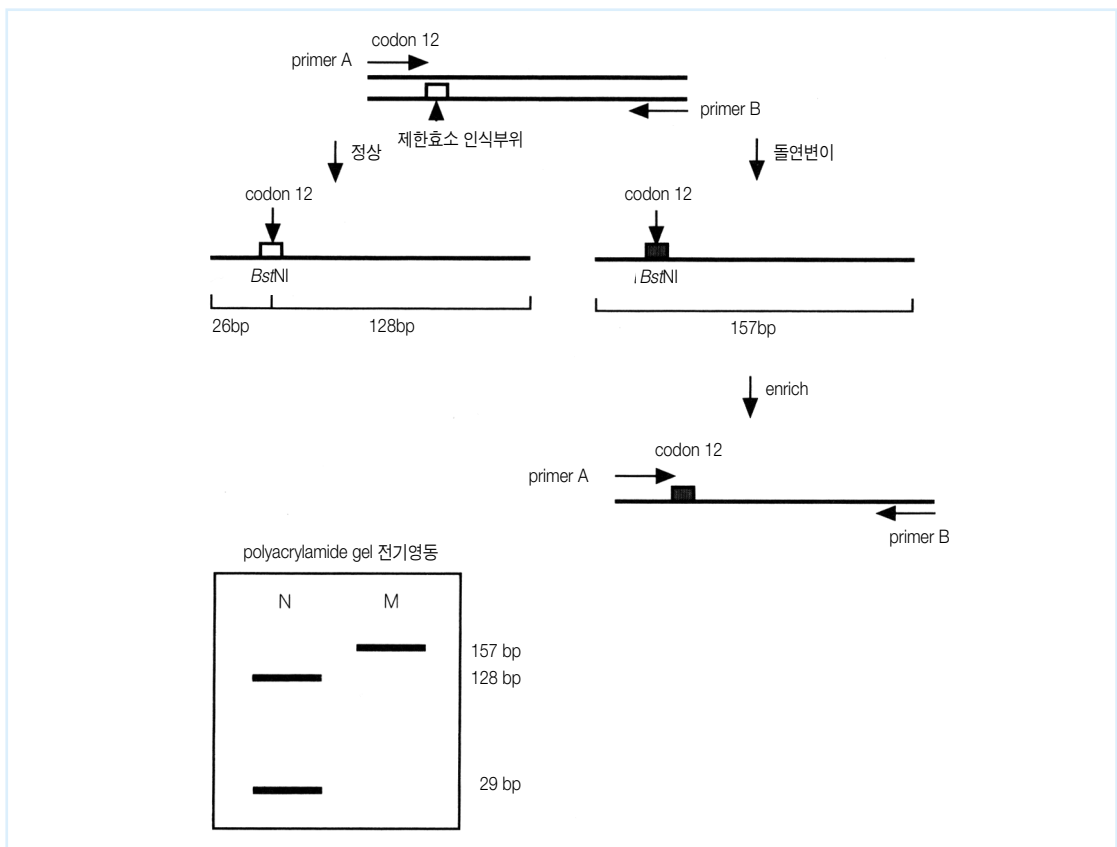


그림 2 PCR-RFLP법에 의한 K-ras 유전자의 돌연변이 검출법의 개요

Primer A, B를 이용하여 K-ras 유전자 exon 1의 일부를 PCR로 증폭하면 157 bp의 PCR 산물이 생성된다. PCR 산물을 BstNI로 처리하면 정상 allele에서는 128 bp와 29 bp로 절단된다. 돌연변이 allele에서는 codon 12 부위에서는 절단되지 않고 157 bp의 allele가 생성된다. 또 PCR에 앞서 제한효소로 절단해 두면 돌연변이 allele만이 특이적으로 증폭되어(enrich) 검출효율이 증가한다.

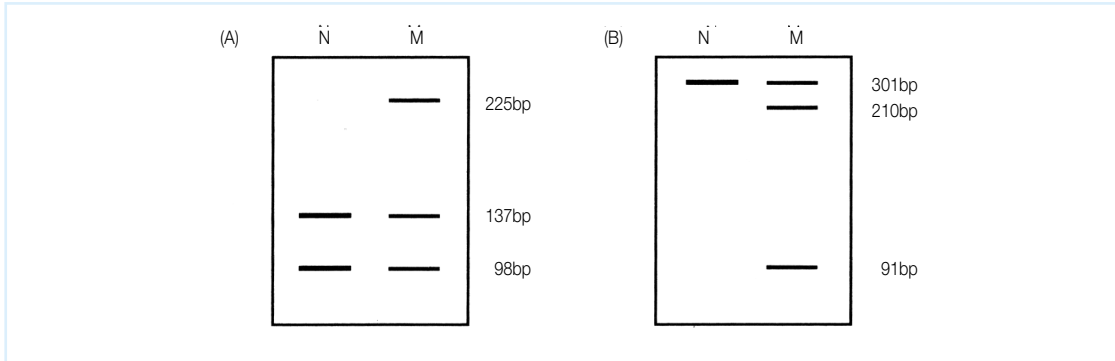


그림 3 PCR-RFLP법에 의한 APC 유전자의 돌연변이 검출의 모식도

(A) APC의 codon 232(CGA)를 함유하는 영역을 PCR법으로 증폭한 후 *Acc* I으로 절단하면 돌연변이 allele에서는 nonsense mutation으로 인하여 CGA → TGA로 되어, *Acc* I의 인식서열(GTATAC)이 소실하므로 PCR 산물은 절단되지 않고 225 bp인 채로 남는다. (B) APC의 codon 932(TCA)가 점돌연변이로 인하여 TCA → TAA로 되면 *Mse* I의 인식서열(TTAA)가 생긴다. Codon 932를 함유하는 영역을 PCR법으로 증폭하여 *Mse* I으로 처리하면 돌연변이 allele에서만 절단되어 210 bp와 91 bp의 allele가 생성된다.

즉 특정 영역을 PCR법으로 증폭한 후 점돌연변이가 생긴 부위를 절단부위로 인식하는 제한효소로 처리하면 점돌연변이가 생긴 DNA에서는 절단되지 않고, 점돌연변이가 생기지 않은 DNA는 길이가 다른 allele로서 검출되는 것이다. PCR법을 병용하여 *K-ras* 유전자 codon 12의 점돌연변이를 검출한 방법²²⁾을 그림 2에 나타내었다. 췌장암, 대장암 등에서는 고빈도로 *K-ras* 유전자의 점돌연변이가 존재함이 보고되었는데^{23, 24)}, 점돌연변이의 거의 대부분이 codon 12에서 발생하였다. *K-ras* 유전자의 codon 11~12에는 제한효소 *Bst*N I의 인식서열(CCTGG)이 존재한다. 이 부위에 점돌연변이가 일어나면 *Bst*N I의 인식서열이 소실된다. 따라서 시료 DNA를 PCR법으로 증폭한 산물을 제한효소로 처리하면 정상 염기서열을 갖는 DNA는 절단되나 점돌연변이를 함유하는 DNA 단편은 절단되지 않고 남아있게 된다. 제한효소로 처리한 PCR 산물은 agarose 또는 polyacrylamide gel 전기영동을 통하여 DNA 단편의 길이 차이로 검출된다. 이 방법에서는 PCR에 앞서 제한효소로 절단함으로써 정상세포가 다수 혼입되어 있는 시료 중의 점돌연변이도 검출할 수 있으며 증폭이 잘 되면 정상세포 $10^3 \sim 10^5$ 개 중 1개의 암세포로도 검출할 수 있다²⁵⁾.

K-ras 유전자 이외에도 많은 유전자의 점돌연변이를 검출하기 위하여 이용되고 있다.

예를 들면, APC(adenomatous polyposis coli) 유전자는 가족성 대장선종증(familial adenomatous polyposis: FAP)의 원인유전자인데 FAP 가족의 환자나 가족에 대하

여 APC 유전자의 선천성 이상의 유무를 screening함으로써 발증전에 진단할 수 있다(그림 3). APC 유전자의 이상이 비교적 많이 검출된 부위에 대하여 PCR법으로 증폭한 후에 적당한 제한효소로 처리하면 점돌연변이로 인하여 제한효소 인식서열이 소실되어버린 경우와 반대로 점돌연변이로 인하여 다른 제한효소 인식서열이 생성된 경우에는 polyacrylamide gel 전기영동에서 정상과 다른 크기의 allele로서 검출된다. 이러한 방법을 이용하여 원인유전자를 분리한 유전성질환에 대하여 carrier로서의 존재여부를 판단하는 발증전 진단을 단시간에 그리고 확실하게 할 수 있어²⁶⁾ 환자의 진단에 귀중한 정보를 얻을 수 있다.

▶ 맺음말

본 고에서는 PCR법과 조합한 RFLP의 응용으로서 유전자의 점돌연변이 검출법에 대하여 설명하였다. 이 PCR-RFLP법을 응용함으로써 다량의 정상세포가 혼입되어 있는 시료에서도 이상 유전자의 염기서열을 선택적으로 농축(enrich)하여 유전자 이상을 검출할 수 있다. 또 다수의 검체를 단시간에 처리할 수도 있으며 또한 유전자 이상의 해석을 통한 예후 판정 및 carrier의 발증전 진단 등의 임상 분야에도 널리 응용할 수 있을 것이다.



참고문헌

- 1) Kimura, A., Sasazuki, T. : *in* HLA 1991 : Proceedings of the Eleventh International Workshop and Conference (ed. Tsuji, K. *et al.*), Vol. 1, pp. 397-419, Oxford University Press, Oxford (1992)
- 2) Date, Y., Kimura, A., Kato, H., Sasazuki, T. : *Tissue Antigens*, in press (1995)
- 3) Yasunaga, S., Kimura, A., Hamaguchi, K., Ronningen, K. S., Sasazuki, T. : *Tissue Antigens*, in press (1995)
- 4) Fischer, S. G., Lerman, L. S. : *in* Methods in Enzymology (ed. Wu, R.), Vol. **68**, pp. 183-191, Academic Press, New York (1979)
- 5) Myers, R. M., Maniatis, T., Lerman, L. S. : *in* Methods in Enzymology (ed. Wu, R.), Vol. **155**, pp. 501-527, Academic Press, New York (1987)
- 6) Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., Myers, R. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 232-236 (1989)
- 7) Sheffield, V. C., Cox, D. R., Myers, R. M. : *in* PCR protocols (ed. Innis, M. A.), pp. 206-218, Academic Press, New York (1990)
- 8) Myers, R. M., Sheffield, V. C., Cox, D. R. : *in* PCR technology (ed. Erlich, H. A.), pp. 71-88, Stockton, New York (1989)
- 9) Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., Maniatis, T. : *Nucl. Acids Res.*, **13**, 3131-3145 (1985)
- 10) Satoh, C., Takahashi, N., Asakawa, J., Hiyama, K., Kodaira, M. : *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, 167-175 (1993)
- 11) Burmeister, M., diSibio, G., Cox, D. R., Myers, R. M. : *Nucl. Acids Res.*, **19**, 1475-1481 (1991)
- 12) Collins, M., Myers, R. M. : *J. Mol. Biol.*, **198**, 737-744 (1987)
- 13) Gray, M., Charpentier, A., Walsh, K., Wu, P., Bender, W. : *Genetics*, **127**, 139-149 (1991)
- 14) Lerman, L. S., Fischer, S. G., Hyrley, I., Silverstein, K., Lumelsky, N. : *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**, 399-423 (1984)
- 15) Lerman, L. S., Silverstein, K. : *in* Methods in Enzymology (ed. Wu, R.), Vol. 155, pp. 482-501, Academic Press, New York (1987)
- 16) Abrams, E. S., Murdaugh, S. E., Lerman, L. S. : *Genomics*, **7**, 463-475 (1990)
- 17) C. Saito 등 : *대사*, **28**, 731-739 (1991)
- 18) N. Takahashi : *일본임상*, **52** (특별호), 467-473 (1994)
- 19) Myers, R. M., Larin, Z., Maniatis, T. : *Science*, **230**, 1242-1246 (1985)
- 20) Winter, E., Yamamoto, F., Almoguera, C., Perucho, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7575-7579 (1985)
- 21) Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., Weissenbach, J. : *Nature Genet.*, **7**, 246-339 (1994)
- 22) Kahn, S. M., Jiang, W., Culbertson, T. A., Weinstein, I. B., Williams, G. M., Tomota, N., Ronai, Z. : *Oncogene*, **6**, 1079-1083 (1991)
- 23) Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. : *Cell*, **53**, 549-554 (1998)
- 24) Vogelstein, B., Fearon, E., Hamilton, S., Kern, S., Preisinger, A., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smith, A., Bos, J. : *New Engl. J. Med.*, **319**, 525-532 (1988)
- 25) Kumar, R., Barbacid, M. : *Oncogene*, **3**, 647-651 (1988)
- 26) Ando, H., Miyoshi, Y., Nagase, H., Baba, S., Nakamura, Y. : *Gastroenterology*, **104**, 989-993 (1993)

PCR에 의한 넓은 영역 (genome)의 해석

I. AP-PCR - 미지 영역의 해석 -

II. RDA법 - Genome DNA 변이의 검출 -

I. AP-PCR

AP-PCR(Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction)이란 단일 primer로 genome 내의 복수영역을 동시에 증폭하는 기술로 1990년에 Welsh와 McClelland가 개발한 것이다¹⁾. 이 방법의 가장 큰 특징은 주형인 genome DNA가 복잡하고 특히 서열정보가 없어도 PCR 증폭산물을 얻을 수 있다는 점이다. 증폭한 PCR 산물 중에는 다형을 나타내는 것도 있어 소위 DNA fingerprint로 이용할 수 있다. 다형 marker를 간단히 얻는 방법은 주로 genome project가 그다지 진행되고 있지 않은 박테리아, 식물 등 생물의 genome

해석에 주로 이용한다^{2, 3)}. 특히 최근에는 사람 암세포의 유전자변이 해석⁴⁻⁶⁾이나 송사리에 방사선을 조사하여 DNA 손상을 해석하는 일⁷⁾에도 위력을 발휘하고 있다. 여기에서는 주로 사람 암 염색체의 양적변화를 해석할 때의 protocol에 대해 설명하였으나 실험시 주의하여야 할 점은 다른 목적의 실험에서도 마찬가지로 적용된다.

1. AP-PCR의 원리

그림 1에 AP-PCR의 원리를 나타내었다. AP-PCR에서는 처음 수회의 PCR 반응시에 primer의 annealing 온도를 낮추고(37~50℃) 또한 반응액의 Mg^{2+} 이온 농도를 높여

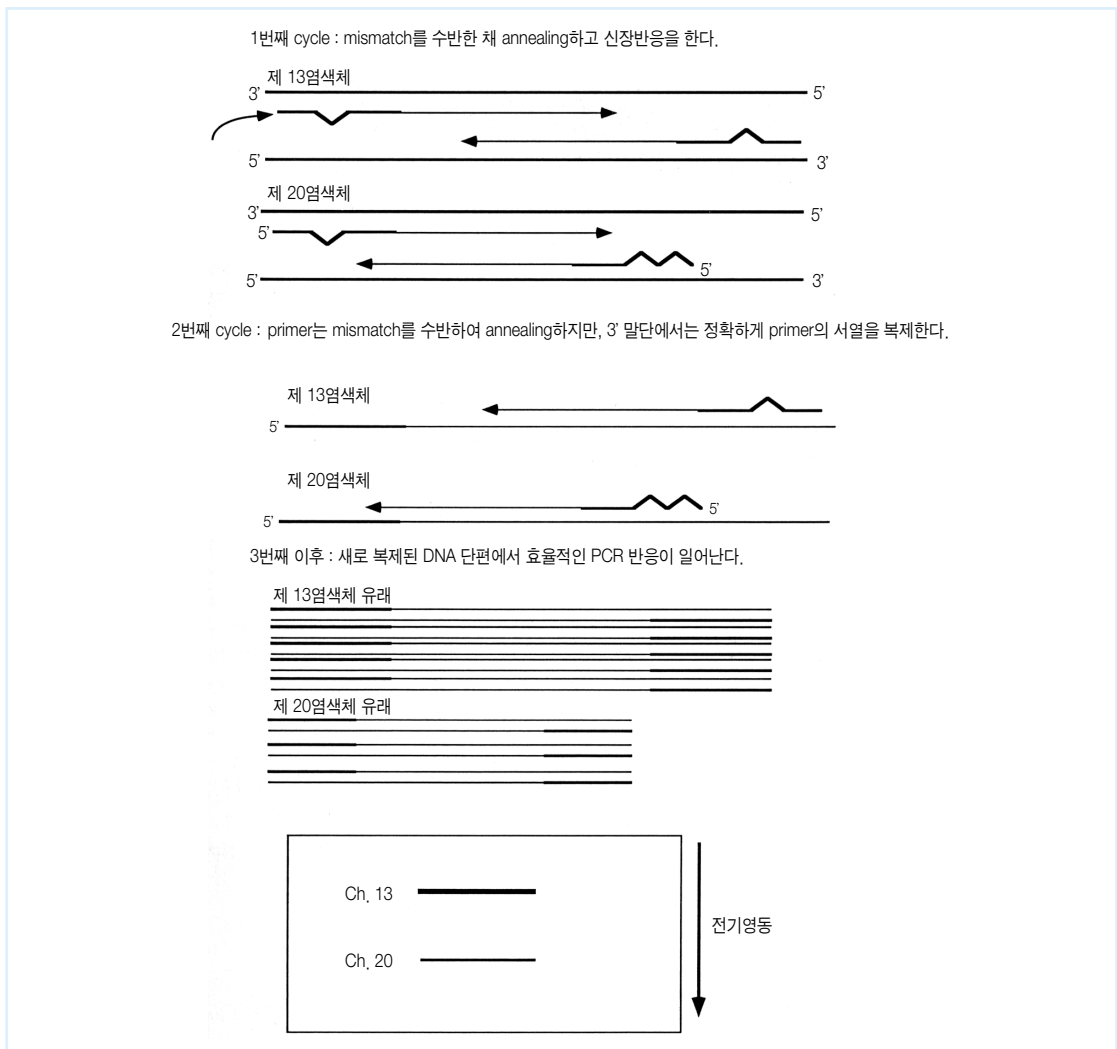


그림 1 AP-PCR의 원리

Primer가 실제로 annealing하는 정도에 대해서는 아직 불명확하나 mismatch가 허용되고 있음을 산 모양으로 나타내었다. 3번째 이후의 cycle에서는 반응이 경합적으로 일어난다. 짝을 찾지 못한 primer가 신장반응하여 background를 형성한다.

(4.5~5.0 mM) primer가 annealing할 때의 서열특이성을 줄인다. 그 결과 단일 primer(AP primer)에 mismatch가 삽입된 형태로 genome의 복수부위에 annealing하여 각 3' 말단끼리 마주본 경우에 증폭반응이 시작된다. 전형적인 AP-PCR에 의해 사람 genome DNA에서 5개부터 많은 경우에는 100개 정도의 독립적인 PCR 산물을 얻을 수 있다⁸⁾. gel 전기영동으로 이들 PCR 산물을 그 길이에 따라 분리하여 DNA fingerprint로서 관찰한다. 그림 2에 실험을 나타내었다. 이는 사람 폐암 증례를 AP-PCR fingerprint로 해석한 것으로 약 20개의 강한 signal을 나타내는 밴드와 다수의 약한 signal을 나타내는 밴드가 검출되었다. 이 signal의 강약 패턴은 실험조건을 바꾸지 않는 한 재현성이 있다. 밴드의 크기는 약 300 bp~2 kbp 사이였다. 길이의 다형성을 갖는 밴드는 S밴드였다. 이처럼 AP-PCR로 AP Primer 1개당 평균 1~2개의 다형 marker를 얻을 수 있다. 또 암세포의 특이적인 변화로서 몇몇 밴드가 양적변화를 일으킴을 확인할 수 있었다(그림 1의 삼각형 화살표).

주형 서열이 어떤 조건을 충족했을 때에 AP-PCR 반응으로 증폭되는 지는 아직 확인되지 않았다.

AP-PCR의 경우 경험적으로 AP primer의 3' 말단 6~7 염기분이 일치하지 않으면 주형과의 annealing 부위에 효율적으로 결합하지 않는다고 알려져 있다. 한편 필자 등의 경험으로는 3' 말단에서 11~12염기만큼 떨어진 두 부위에 변이를 주는 것만으로 fingerprint의 패턴은 크게 변화하였다. 따라서 3' 말단이 일치하여야 하며, primer 서열 전체에서 GT mismatch 등의 열역학적으로 비교적 안정한 mispairing 등을 고려하거나 두 primer 사이의 영역에서 PCR 증폭반응이 쉽게 일어날 수 있도록 해야 한다.

AP-PCR의 하나의 특징은 “반정량성”이다. 즉 각 PCR 산물을 검체간에 비교하면 그 검체의 주형이 되는 서열의 양비를 반영할 수 있다. 예를 들면 그림 2에서 X염색체 유래의 밴드(B₀ 및 G) signal은 여성의 것으로 확실히 남성보다는 강하다. 이는 세포내 X염색체의 copy 수의 차이(여성은 2개, 남성은 1개)를 반영하는 것이다. 반정량성에 대하여 엄밀한 실험적 확인을 거치지지는 않았다. AP-PCR과 아주 유사한 원리를 갖는 LS-PCR(Low Stringent PCR)로 특이적으로 증폭되는 목적의 PCR 산물과 목적 대상이 아닌 비특이적 PCR 산물 사이에 완전한 경합이 일어나 아주 높은 정량성을 나타낸다는 보고가 있었다. 그 결과를 바탕

으로 AP-PCR에 대해 유추해 보면 적어도 2개의 요소가 AP-PCR 산물의 정량성에 관여하는 것 같다. 즉, 그 하나의 요소는 반응 후반부의 서열 특이적인 cycle에서 주형 DNA는 그 단계까지 생산된 PCR 산물이라는 것이다. 이는 동일 primer에 의해 증폭되기 때문에 경합적 반응을 보증할 수 있다¹⁰⁾. 또 다른 하나의 요소는 초기의 완전한 조건에서는 PCR효율이 낮고, PCR cycle이 증폭의 직선성을 유지하는 범위로 진행된다는 것이다. AP-PCR 산물 중 특정 PCR 산물이 어느 정도 생산되었는지를 고찰하였다. Mismatch가 허용되는 경우 polymerase 반응이 잘 일어날 확률을 부위별로 각각 P₁, P₂라 하고 완전히 match한 경우는 polymerase 반응이 100% 일어난다(즉 1 cycle로 2배가 된다)고 가정한다.

반응 tube 내의 주형 DNA의 copy 수를 N₀로 한다.

또 PCR시의 incorporation error를 무시한다면 PCR 산물의 copy 수는 다음 식으로 계산할 수 있다.

$$N_x = N_0 P_1 P_2 (2^x - x - 1)$$

P₁=P₂=0.1, x=5일때, N_x=0.26 · N₀가 되어 원래의 주형과 동일한 copy 수가 되려면 다시 2 cycles가 필요함을 알 수 있다. 따라서 동량의 주형 DNA를 사용한 통상의 PCR과 비교하면 위의 경우에는 30-5-2=23 cycles로 통상의 PCR에 비해 2~7 cycles 적다. 따라서 보다 정량성을 유지하는 범위 내에서 증폭이 이루어지고 있음을 추측할 수 있다.

2.AP-PCR의 실제(암조직 DNA를 해석하는 경우)

(1) PCR

| | |
|--|-----------|
| Human genome DNA | 20~100 ng |
| 10× PCR buffer | 1.5 μl* |
| 2.5 mM dNTP Mixture | 0.75 μl |
| 100 mM MgCl ₂ (최종농도 4.5 mM) | 0.45 μl |
| AP-primer(50 μM) | 0.3 μl |
| Taq polymerase | 0.12 μl |
| [α- ³² P][dCTP(3000 Ci/mmol)] | 1.5 μCi |
| Mili Q H ₂ O | 10.8 μl |
| Total | 15 μl |

* 10× PCR buffer를 사용할 경우에는 그 내용물을 확인하여 MgCl₂의 양을 조절한다.

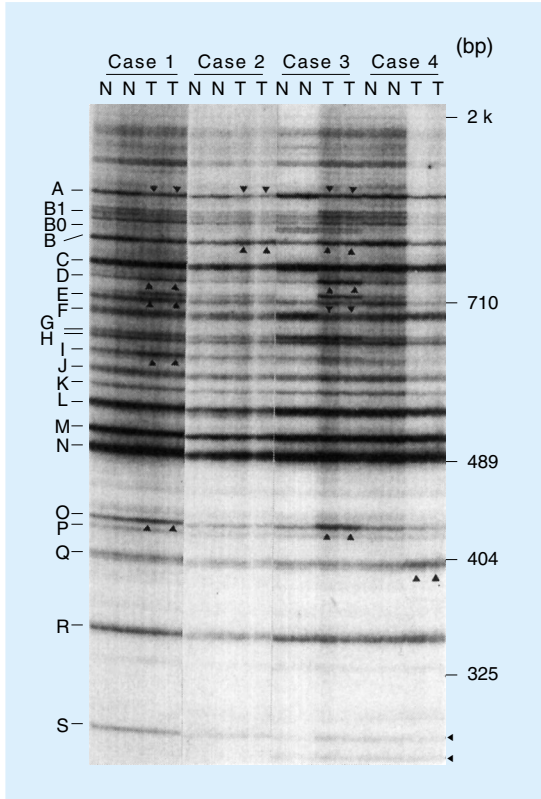


그림 2 AP-PCR

본문에 나타난 조건으로 실험하였다. 이는 사람 폐암조직 내 염색체의 증감을 해석한 예이다. N은 정상조직 유래, T는 암조직 유래의 DNA fingerprint이다. 두 개씩 나열한 것은 각각 25 ng, 50 ng으로 시료의 양을 바꾸어 재현성을 확인하기 위해서이다. 사진의 왼쪽에는 각 밴드의 이름을 오른쪽에는 크기를 나타내었다. Case 3은 여성이다. ▲는 signal의 증가를, ▼는 signal의 감소를 나타낸다. 오른쪽 밑에는 밴드 S의 다형을 나타낸 각 allele를 삼각형으로 표시하였다.

앞의 시약을 혼합한 뒤 Thermal Cycler로 아래의 프로그램에 따라 PCR을 실시하였다.

94℃에서 5분 반응 후, 94℃에서 30초, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초의 cycle을 5회 실시하고, 이후는 94℃ 15초, 60℃ 15초, 72℃ 1분을 25회 반응한 뒤 72℃ 7분간 신장반응하여 종료한다.

PCR 반응액 5 μ l를 취하여 12 μ l의 formamide로 희석한다.

(2) Gel 전기영동

아래에 기술한 제조법은 GENOQUENCER 전기영동장치(ATTO사)를 이용한 것이다. 이 실험에서는 PCR-SSCP와 같이 엄밀한 온도조절이 필요없으므로 이러한 장치가 없다고 해서 실험이 안되는 것은 아니다.

| | |
|---------------------------|---------|
| 45% Acrylamide (A:B=44.1) | 12.5 ml |
| Urea(Ultra pure) | 43 g |
| 1.6% 과황산암모늄 용액 | 6 ml |
| 10× TBE Buffer | 10 ml |
| Mili Q H ₂ O | 적당량 |
| Total | 100 ml |

Mili Q H₂O로 약 90 ml까지 채우고 magnetic stirrer로 urea를 완전히 녹인 후 최종적으로 100 ml로 채운다. 내경 0.2 μ m의 필터로 여과한 다음 용액이 든 비커를 10~20분 정도 얼음물 속에 담가 용액을 충분히 냉각한다. 유리판(세로 40 cm×가로 30 cm)의 조립은 통상의 polyacrylamide gel과 같은 방법으로 세 변을 테이프로 밀봉한다. Spacer는 Wedge Spacers(0.4~1.2 mm, Cat. 400138)를 사용하고 고무는 64 well용 shark tooth comb(400125)를 사용하였다. 이 spacer는 GENOQUENCER 장치의 유리판에 비해 약간 길므로 두꺼운 쪽의 끝을 잘라낸다. 또 이 spacer는 폭이 넓으므로 세로로 잘라 1 세트분을 1개로 만들 수도 있다. 냉각한 gel에 100 μ l의 TEMED를 넣고 혼합하여 유리판 사이에 그대로 주입하여 제조한다. Gel이 굳을 동안(1 시간 이상) 전기영동장치를 세팅한다.

전기영동 buffer로는 1× TBE를 사용하고 정전력은 55 W를 유지한다. 온도조절은 필요없으나 순환펌프를 사용하는 경우에는 55℃에 설정한다. 위의 조건으로 30분간 prerun한 후 시료를 2.5 μ 씩 loading, 6시간 30분간 전기영동한다. 전기영동이 끝나면 gel dryer로 건조(80℃, 1 시간 30분)하고 형광펜으로 위치를 표시한 후 실온에서 하룻밤 동안 X선 필름을 감광한다. 이 조건으로 약 300 bp~2 kbp까지의 PCR 산물을 확인할 수 있다.

(3) 산물의 Cloning

해석하고자 하는 밴드는 잘라내어 cloning할 수 있다^{4, 6)}. Cloning한 산물이 실제로 AP-PCR fingerprint에서 관찰한 밴드와 동일한 것인지를 최종적으로는 PCR fingerprint에 대한 Southern Blotting을 실시하여 확인할 필요가 있다⁸⁾.

목적 밴드는 건조한 gel에서 약 2 × 2 mm의 크기로 잘라낸다. 이에 대해서는 PCR-SSCP법의 각종 매뉴얼을 참고한다. 이 gel은 다음 해석에 절대 필요하므로 잘 보관한다. 잘라낸 gel을 100 μ l의 Mili Q H₂O에 넣은 후 80℃에서

15분간 가열하여 PCR 단편을 용출한다. 용출한 산물은 동일한 primer를 사용하여 통상의 방법으로 PCR을 실시한 후 TA cloning법으로 cloning을 실시 한다.

A. PCR

| | |
|--|--------------|
| 용출한 DNA 단편 | 1 μ l |
| 10× PCR Buffer (MgCl ₂ 의 최종농도는 1.5 mM) | 2 μ l |
| 2.5 mM dNTP Mixture | 1 μ l |
| AP-Primer(50 μ M) | 0.4 μ l |
| Taq Polymerase | 0.15 μ l |
| Mili Q H ₂ O | 15.5 μ l |
| Total | 20 μ l |

위의 시약을 혼합한 후 Thermal Cycler로 다음의 프로그램으로 PCR을 실시한다.

94℃에서 5분간 변성한 후 94℃ 15초, 60℃ 15초, 72℃ 1분의 조건으로 30회 반응하고, 72℃ 7분간 신장반응을 한 뒤 종료한다.

PCR 산물을 agarose gel 전기영동으로 확인하여 TA cloning을 실시한다.

B. AP-PCR 산물의 Southern Blotting에 의한 clone 단편의 확인

통상 AP-PCR 산물은 polyacrylamide gel로 전기영동한다. Polyacrylamide gel로부터 DNA를 transfer하기 위해서는 모세관 원리로는 곤란하여 electroblotting을 실시한다. 건조한 변성 polyacrylamide gel의 DNA를 electroblotting을 이용하여 효과적으로 transfer하기 위해서는 조건검토가 필요하다. 그러나 여기서는 PCR 산물을 이용하므로 분자량이 비교적 작고 copy 수가 많은 상태이므로 모세관현상에 의한 DNA의 transfer로도 1개의 DNA 단편의 확인이라면 통상 문제없이 southern blotting으로 signal을 확인할 수 있다.

또 alkali 처리로 polyacrylamide가 분해된다는 설도 있으나 거의 문제가 되지는 않는다.

3. 유의점

우선 AP-PCR에 사용하는 primer는 지금으로서는 시행착오를 거치면서 유용한 것을 찾을 수 밖에 없다. 실제로 새로운 것을 제작하려 한다면 다른 연구자가 별도의 목적으로 합성한 primer를 받아 확인해 보는 것도 좋다. 일단은

GC 함량이 높은 것이 다형과 밴드가 많이 출현할 것이다. 필자 등은 몇개의 시료를 실제로 시험해 보고 밴드 형태의 결과에 따라 primer를 선택하였는데 대체로 10~20% 정도가 아주 좋은 primer였다.

다음으로는 재현성을 유지하는 것이 매우 중요하므로 아래의 사항들에 유의한다.

AP-PCR 반응은 각종 시약의 질, 농도 등에 영향을 크게 받기 때문에 실험을 자주하는 경우에는 PCR에 사용하는 시약류를 한번에 대량으로 조제한 후 분주하여 freezer에 보존해 두는 것이 좋다.

AP-PCR은 반응에 사용하는 내열성 polymerase에 따라 나타나는 밴드 형태가 다른 경우가 있다. 동일한 원리를 적용하는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)⁹⁾는 똑같은 재조합 Taq Polymerase라도 제조회사에 따라 형태가 다르게 나타난다는 보고가 있다¹¹⁾. Stoffel fragment는 exonuclease 활성이 없는 내열성 polymerase로 AP-PCR, RAPD 등을 보다 높은 재현성으로 실시할 수 있다고 한다¹²⁾.

실험의 재현성을 좌우하는 요소의 하나로 주형이 되는 genome DNA의 순도를 들 수 있다. 필자 등도 사람의 각종 종양 중에서 조직 중에 다당류를 다량 함유하는 종양 유래 DNA와 함유하지 않는 조직의 DNA를 동일한 조건으로 반응하였으나 나타나는 밴드 형태가 차이가 생기는 경우가 있었다.

실제로 결과의 해석상의 문제점으로서, 상기 실험조건으로 전기영동을 실시한 경우 1개의 밴드 내에 복수의 AP-PCR 산물이 존재하는 경우가 있다. 이것은 예를 들면 다형성을 갖는 AP-PCR 산물의 다형성 모드(양성/음성다형 또는 길이의 다형)를 판단하는 데 중요하다. 또 각 PCR 산물의 양적변화로부터 암세포의 산물이 국제하는 염색체의 양적 이상을 추정하고자 할 경우에는 이러한 밴드의 형태로서는 해석하기가 곤란하다.

▶맺음말

최근에 필자 등은 사람의 AP-PCR 각 산물의 염색체 국계를 사람/설치류 잡종세포의 DNA panel을 이용하여 비교적 간단하면서도 거의 모든 밴드를 결정할 수 있는 방법을 개발하였다(SHARP법). 이 방법으로 필자 등은 약 4~5개의 primer로 사람의 모든 염색체에 대하여 AP-PCR 산물로 최저 한 부위를 확보할 수 있음을 판명하였다. 이 방법으로 위에서 서술한 바와 같이 밴드 내에 PCR 산물이

복수 존재하는 경우도 밝혀 내었다. 또한 이 방법으로 암세포 염색체의 양적 이상을 분자생물학적으로 해석하는 방법이 현실화 되었다. 금후에는 형광색소에 의한 AP-PCR의 자동해석 등 임상분야에서의 응용도 기대할 수 있을 것이다.

II. RDA법

Genome 연구가 진전함에 따라 positional cloning에 의한 질환유전자의 cloning이 급속도로 진행되고 있다. 그러나 그 제1단계인 질환유전자좌의 동정이 올속단계이다. 종래에는 genome DNA의 변이를 검출하기 위하여 subtraction법을 널리 사용하였다. 일반적으로 한 검체 (tester)를 대량의 다른 검체(driver)와 혼합함으로써 tester 검체에만 존재하는 DNA 단편을 농축 및 고정할 수 있다. 현재까지는 Y염색체에 특이적인 DNA 단편의 cloning, X염색체 결실부위로부터 DNA 단편을 동정, 암세포에서 증폭한 DNA 단편을 검출하는데 사용하였다. 그러나 고등동물의 genome은 복잡하여 종래의 방법으로 이들을 비교하기에는 감도가 불충분하였다. 즉 genome DNA의 복잡도(complexity)가 높으면 tester와 driver의 혼합액 내의 각 DNA의 농도를 충분히 높일 수 없어 hybrid 형성이 불충분하므로 subtraction 조작을 여러번 반복해도 100배 정도밖에 농축(enrichment)할 수 없었으므로 효율적인 방법의 개발이 필요하였다. RDA(representational difference analysis)법은 PCR의 특성을 충분히 살린 기법으로 whole genomic PCR로 증폭한 genome DNA의 일부(representation)를 subtraction법으로 비교하여 변이 DNA를 검출 및 증폭하는 것이다¹³⁻¹⁵⁾. PCR 과정에서 경합반응이 일어나면 짧은 DNA 단편이 높은 효율로 증폭된다. PCR 반응으로 얻은 DNA 단편의 pool은 genome 전체에 비해 복잡도가 낮기 때문에 효율적인 subtraction을 실시할 수 있다. 따라서 PCR로 선택한 산물을 기하급수적으로 증폭할 수 있다. Genome 전체를 해석하는 기술로는 RLGS(restriction landmark genome scanning)법 등이 있다. RLGS법은 1000개가 넘는 spot을 어떻게 하면 재현성 있게 2차원 전기영동으로 전개하는 방법과 spot의 위치 및 농도를 해석 처리하는 문제가 해독의 포인트로 그 해상력은 spot의 수에 의존한다. 이에 비해 RDA법으로는 특수 장치가 없어도 즉시 해석 가능한 marker를 얻을 수 있어 whole genome을 해독하는 기술로서 높은 해상력을 갖는다. 아래에 그 원리 및 응용 예를 개설한다.

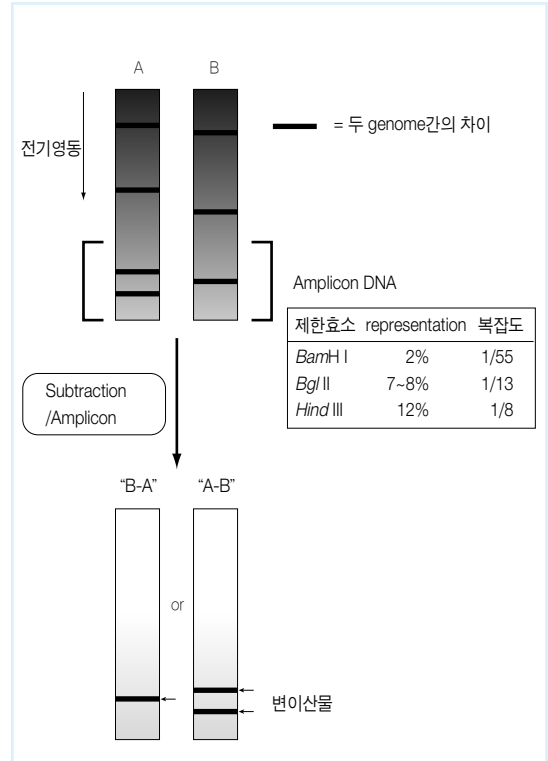


그림 1 RDA법의 개요

두개의 서로 다른 genome간에는 제한효소 절단단편의 길이에 의한 형태의 다형, 즉 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 비롯한 변이가 존재한다. 이들 genome간의 차이를 검출하기 위하여 whole genomic PCR로 genome의 일부를 증폭하여 복잡도를 줄인 "amplicon"을 서로 비교함으로써 효율적인 subtraction을 할 수 있다.

1. RDA법의 원리(그림 1)

RDA법은 subtraction의 효율을 높이기 위하여 representation과 kinetic enrichment(농축)를 조합한 것이다. Representation 과정에서는 두개의 genome DNA를 제한효소로 절단한 후 adaptor 분자를 부가하여 whole genomic PCR로 genome의 일부인 0.1~1.5 kb의 DNA 단편을 증폭한다. 즉 크기가 긴 DNA 단편은 PCR로 증폭하지 않고 일부만이 증폭될 수 있으므로 genome의 복잡도가 낮아져 subtraction법의 효율을 높일 수 있다(그림 2a). 제한효소가 인식하는 염기서열의 빈도에 따라 genome 전체 중 2~15%를 선택적으로 증폭할 수 있어 비교하는 genome의 크기를 60~450 Mb로 줄일 수 있다. 물론 representation을 높임에 따라 복잡도도 증가하기 때문에 6염기를 인식하는 효소 BamHI, BglII 등이 적당하다. 이 과정에서 제한효소의 인식부위에 다형이 존재하

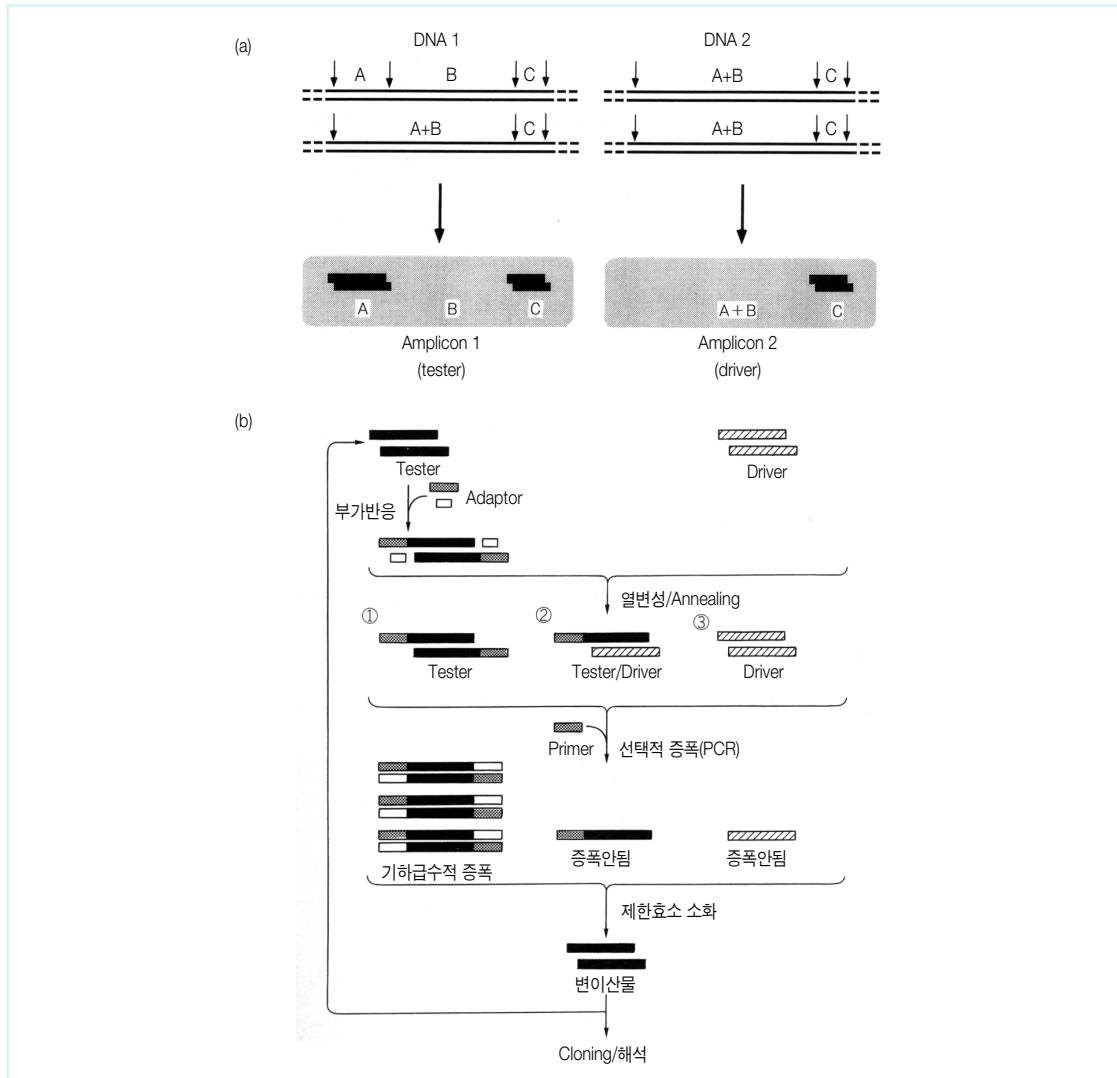


그림 2 RDA법

(a) Representation 과정. 화살표는 제한효소의 절단부위를 나타낸다. 절단으로 생긴 짧은 DNA 단편만이 whole genomic PCR로 증폭되고 복잡도가 감소한 DNA pool, 즉 amplicon을 만든다. DNA 1과 DNA 2 사이에 존재하는 제한효소부위의 차이는 tester와 driver amplicon을 구성하는 DNA 서열의 차이로 전환된다. 예를 들면 DNA 단편 A는 amplicon 1에 포함되지만 amplicon 2에는 포함되지 않는다. (b) 농축 과정. tester amplicon DNA에 새로운 adaptor 분자를 결합한 후 tester와 driver를 혼합하여 열변성하고 hybridization한다. 재결합한 duplex 분자는 3종류로 존재한다. ① tester에만 포함되는 DNA strand는 homoduplex를 형성하고 양 5' 말단에 adaptor 분자를 갖는다. ② driver와 tester의 hybrid duplex로 한쪽 말단에만 adaptor 분자를 갖는다. ③ driver DNA 유래의 homoduplex로 adaptor 서열을 갖지 않는다. Primer가 결합하는 서열을 만들어 Taq Polymerase로 fill-in 한 후 PCR 증폭한다. 이 과정을 3~4회 반복하며 새로운 hybridization을 시작하기 전에 앞 step과 다른 adaptor를 결합한다.

는지의 여부에 따라 amplicon DNA pool에서의 representation의 유무에 의해 변환된 것이 된다. 다음으로 농축 과정에서는 subtraction법과 PCR에 의한 동적농축의 조합으로 tester에 특이적인 DNA 단편이 증폭된다(그림 2b). Driver DNA amplicon에 포함되지 않은, 즉 tester DNA amplicon에만 존재하는 DNA 단편은 hybridization 과정에서 homoduplex를 형성하므로

tester DNA 단편에만 미리 adaptor 분자를 부가한 것이 되어 이후의 PCR 반응에서 기하급수적으로 증폭할 수 있다. 한편 driver DNA 분자와 double strand를 형성한 heteroduplex는 한쪽 말단에만 primer가 결합하기 때문에 직선적인 증폭이 일어나 목적의 DNA 단편을 선택적으로 증폭할 수 있다(그림 4). Subtraction과 PCR 증폭을 반복할 경우 두개의 다른 adaptor 분자를 준비하여 서로

이용함으로써 앞 step에서 생기는 비특이적인 산물의 증폭을 방지할 수 있다. Rosenberg 등¹⁶⁾은 homoduplex 분자를 biotin화하여 선별함으로써 농축 과정을 더욱 효과적으로 하여 hybridization 과정을 간소화한 변형방법을 개발하였다.

(1) 주의점

RDA법은 contamination에 민감하다. 처음의 실험에서는 virus DNA 등의 양성대조와 함께 실시하는 것이 바람직하다. 재현성을 높이기 위해서도 일련의 실험에서 동일 batch의 buffer, 효소를 사용하는 것이 좋다.

A. DNA의 품질

비교하는 검체간에 동일한 representation을 얻기 위해서는 제한효소로 완전히 절단하는 것이 중요하다.

B. 시약의 순도

합성 oligonucleotide 등에서의 혼입물은 간혹 DNA ligase 등의 반응을 저해한다. Ligase 반응의 가부 판정을 위하여 ligase 반응액의 일부를 전기영동하여 adaptor를

부가함으로써 좋다. 왼쪽으로의 shift가 일어나는 지를 확인하는 것이 좋다. 또 충분한 증폭량을 얻기 위해서는 활성이 확실한 Taq Polymerase를 충분한 양으로 사용하는 것도 중요하다.

C. 반응의 정밀도

정확한 tester와 driver의 비를 결정하는 것은 효율적인 subtraction에 있어 중요하다. Amplicon DNA의 농도를 확인하기 위하여 기존의 방법에 따라 전기영동한 시료를 형광으로 정량해 보았으나 정량성이 부족하여 primer를 함유하는 저분자의 산물을 Centricon-100(Amicon) 및 Sephacryl 1-S300(Pharmacia) 등의 column으로 제거한 후 분광광도계로 측정하였다.

2. RDA법의 응용

(1) 새로운 병원체의 검출

감염 세포 유래의 DNA를 tester로 하고 비감염 세포의 DNA를 driver로 하여 비교하면 감염병원체를 검출할 수 있다. 원리적으로는 동일개체의 검체를 비교해야 하지만

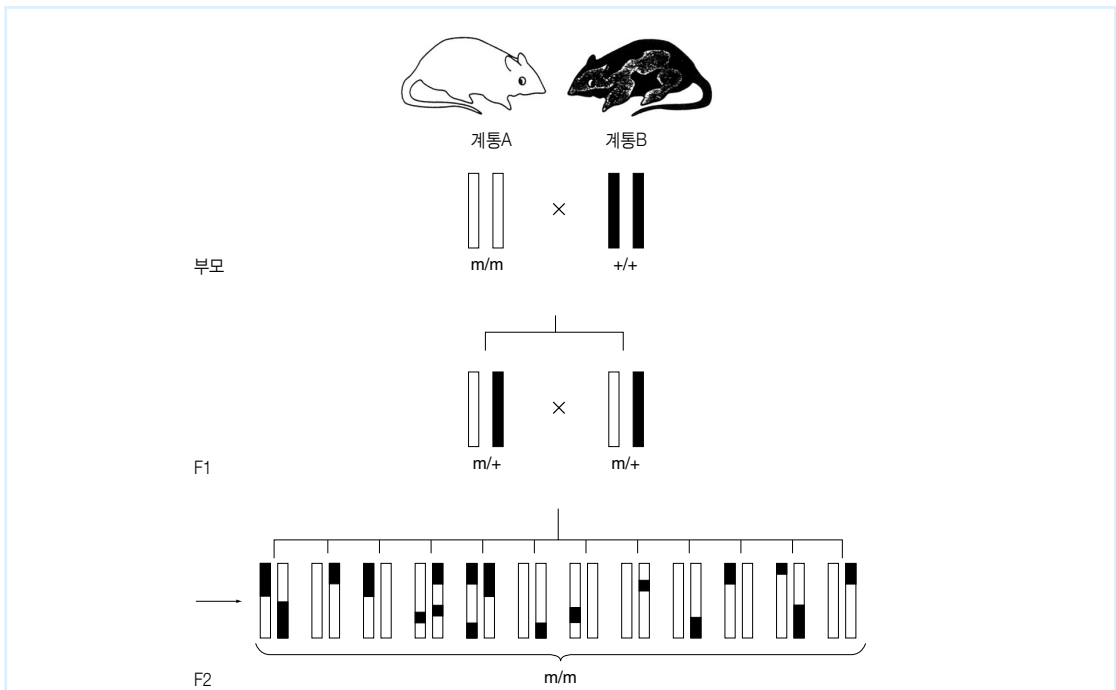


그림 3 Genetically directed RDA

계통 A는 열성형질 m를 가지며, 계통 B는 야생형이다. 각 유전자 형을 흰색과 검정색으로 표시하였다. F1 교배로 F2를 제작하고 F2 개체중에서 변이형질을 띠는 개체만을 선별한 뒤, 이 DNA를 driver DNA로 이용하였다. 선택한 F2 개체는 모든 유전자좌의 주변에 계통 A 유래의 균질성을 갖는 집단으로, RDA법에 의한 계통 A에 특이적인 marker의 제작에 이용할 수 있었다.

목적 병원체가 혈액 등에도 존재할 경우에는 비감염 검체에 혈액이 혼입하여 감염 세포 또는 병원체가 미량이지만 섞이는 경우가 있고, 또 다른 조직을 사용하면 조직에 독특한 상재균이 존재함에 따라 subtraction에 지장을 초래하는 경우도 있다. 그러므로 경우에 따라서는 일관성 실태아의 어느 한쪽에서 비감염조직을 채취하는 것도 한 가지 방법이다. Chang 등¹⁷⁾은 AIDS 환자에 생긴 capodi 육종조직으로부터 병원체를 동정하기 위해 RDA를 실시하였는데, subtraction을 3회 실시한 결과 herpes virus와 유사한 염기서열을 얻었다.

(2) 질환관련 DNA marker의 분리

RDA법은 단일인자 유전형질의 책임유전자좌의 근방에 위치하는 다형성 marker를 얻는데 응용할 수 있어 mouse 등 실험동물의 유전자 해석에 유용하다. 또 사전에 DNA marker를 필요로 하지 않으므로 다른 동물의 유전자 해석에도 유효하다. 첫번째 접근법은 congenital mouse를 이용하는 것이다. 여러번 야생형과 역교배함으로써 다른 계통의 근교 mouse와 책임유전자좌를 이동시킨 congenital mouse의 원계통 유래의 DNA는 책임유전자의 주변을 포함하여 genome 전체의 약 0.1%, 즉 3~4 MB의 크기를 갖는 것으로 예상한다. 이 congenital mouse를 tester, 야생형 mouse를 driver로 하여 RDA를 실시하면 원래의 계통에 독특한 다형을 나타내는 DNA 단편이 증폭한다. Lisityn 등은 *pudgy*나 *tottering*이라 불리는 변이 mouse의 유전자좌 주변의 marker를 제작하였다고 보고하였다¹⁸⁾. 그러나 congenital mouse를 제작하기 위해서는 2년 이상의 시간이 소요된다는 것이 난점이다. 따라서 다른 계통의 근교 mouse와 교배할 때 F₂ intercross를 이용하여 변이형질을 갖는 개체를 모으면 목적의 유전자좌 주위만을 원래의 계통으로 균일화하여 RDA를 실시할 수 있다 (genetically directed RDA; GDRDA, 그림 3).

즉 상염색체 열성의 변이형질을 갖는 mouse 계통을 A, 교배는 가능하지만 유전적 다형을 갖는 mouse 계통을 B로 규정한다. 교배한 F₂ 개체 중에서 변이형질을 갖는 것을 반드시 책임유전자좌 주변의 genome 영역을 포함하고 있으므로 다수 개체의 DNA를 모으므로써 주변만이 A유래가 되고 다른 영역은 재조합으로 인하여 A와 B가 혼합된다. 이를 driver로, B의 DNA를 tester로 하여 RDA를 실시하면 책임유전자좌 주변에 존재하는 B에 특이적인 다형

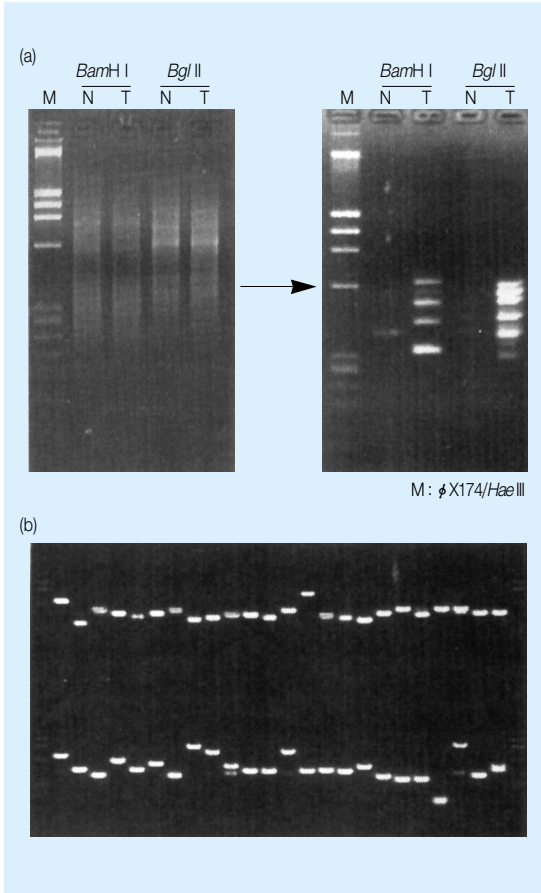


그림 4 Amplicon DNA와 RDA 산물

(a) 당초 whole genomic PCR로 만든 DNA pool은 약 1.5 kb 까지의 DNA 단편으로 구성되며 전기영동상에서 smear하게 나타난다. Subtraction과 증폭을 반복하면 여러 개의 특이한 밴드가 생긴다. 증폭된 DNA를 적당한 plasmid 등에 subcloning하여 실제의 변이 유무를 해석한다. (b) Vector primer로 48개 subclone의 삽입서열을 PCR로 증폭하였다.

성 marker는 driver pool에 포함되지 않으므로 subtraction을 받지 않고 증폭된다. A에 특이적인 allele가 우연히 균일하게 잔존하는 것을 방지해 주거나 균질한 영역을 좁히기 위하여 F₂ 개체는 최소한 10개 이상을 pool하는 것이 바람직하다. 또 목적유전자좌의 주변에 존재하는 기지의 marker를 이용하여 그 사이에서 재조합을 일으키는 F₂ 개체를 pool하면 균질한 영역을 더욱 축소할 수 있어 보다 주변에 가까운 marker를 효율적으로 증폭할 수 있다. 또 상염색체의 우성 형질에 대해서도 열성인 형질을 갖는 개체의 DNA를 pool한 것을 driver로 사용하면 동일하게 해석할 수 있다.

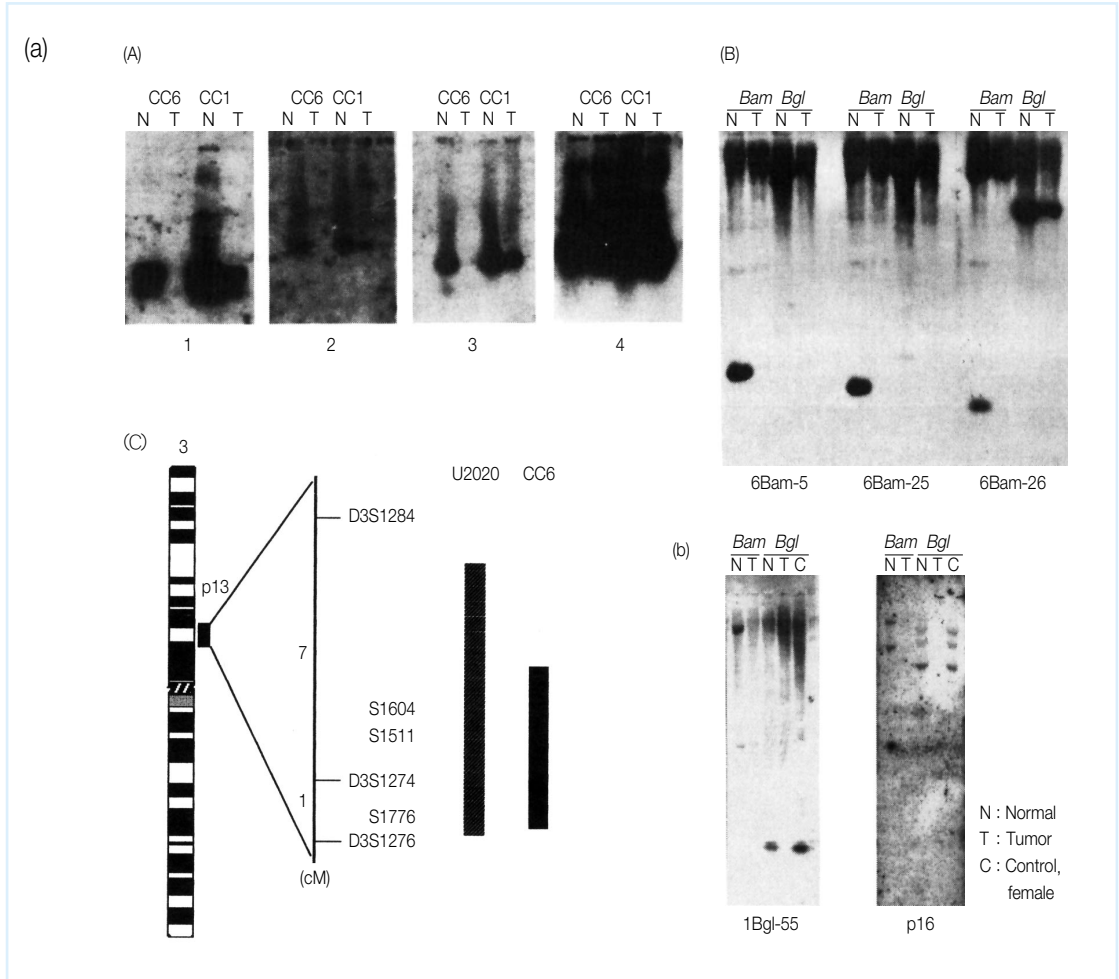


그림 5 암세포에서의 염색체 동형결실의 동정

(a) 자궁경부암세포주 CC6에서의 동형결실. (A) Amplicon blot에 의한 변이산물의 해석. 산물 1~3은 중앙 DNA(T)에 결실이 일어난 것이며 산물 4는 비특이적인 증폭산물이다. (B) Southern Blot에 의한 변이산물의 해석, *Bam*HI 및 *Bgl*II를 사용하여 해석한 결과, 11개의 동형결실 marker를 얻었고 이들 모두가 사람의 3번 염색체의 short arm 영역 중 3p12~13에 mapping 되었다. 얻은 반결실 marker도 거의 동일한 수로 나타났는데 이는 효율적으로 동형결실 산물을 얻을 수 있음을 의미한다. (C) 폐암세포주 U2020와 경암세포주 CC6의 공통 동형결실 영역. (b) 신장암세포주에서의 동형결실. 얻은 동형결실 marker 1Bgl-55는 제 9염색체의 short arm 영역 중 9p21로 mapping 되었으며 동일한 위치에 존재하는 p16 및 p15 유전자에는 동형결실이 일어났다.

(3) 암세포의 유전적 변이의 검출

암화 과정에서는 유전자 결실, 증폭 등의 변이가 축적되는데 whole genome를 대상으로 scanning 하는 방법으로는 RDA법이 유용하다. Tester와 driver를 어떻게 설정하는냐에 따라 2가지 응용이 가능하다. 첫째, 정상세포 DNA를 driver로 이용하면 종양에서 증폭한 DNA를 검출할 수 있다. 둘째, 암세포 DNA를 driver로 이용하면 암세포 DNA에 특이한 DNA 변이, 즉 염색체 결실을 검출할 수 있다. 암억제유전자는 암화 과정에서 양쪽 allele가 불활성화되기 때문에 동형결실 영역에 포함될 가능성이 높다. 일반적

으로 그 범위가 작은 경우가 많으므로 동정은 억제유전자 좌의 해석에 아주 유용한 정보가 된다.

최근에는 LOH(loss of heterozygosity) 검출에서 (CA)_n 반복 서열을 이용함으로써 종래의 RFLP 해석과는 달리 다수의 marker를 해석하기가 훨씬 쉬워졌다. 물론 (CA)_n 해석에서 얻은 정보로는 어디까지나 두 allele간의 비율만 해석할 수 있으며, 또 Southern Blot Analysis에 비해 신중을 기해야 한다. 특히 정상조직의 혼입이 많은 경우에는 PCR로 동형결실을 검출하기가 어렵다. LOH 부위에서 얻은 marker는 다형을 갖는 자체만으로 한정되지만 RDA법

에서는 amplicon에 포함된 DNA 단편 중 동형결실 영역은 모두가 증폭되므로 marker로 획득할 수 있다. 획득한 marker를 probe로 하여 Southern Hybridization을 하면 반결실인지 동형결실인지를 구별할 수 있다. 반결실 marker도 그 다형성을 활용하면 다른 검체의 LOH 빈도를 알 수 있다(그림 4, 5).

실제로 최근 RDA법을 이용하여 신장세포암, 대장암, barret 식도¹⁹⁾, 췌장암²⁰⁾ 등에서 동형결실 영역을 검출하였다. 필자 등도 해석을 실시한 16가지 중 11가지의 예에서 변이산물을 증폭하였는데 그 중 3가지는 동형결실이었다. 자궁경부암 CC6에서는 제 3염색체의 short arm에 존재하는 동형결실 영역으로부터 11개의 동형결실 marker를 얻었으며, YAC 해석 결과 모두 약 3~4 MB의 contig에 포함되어 있음을 알 수 있었다. 이 영역은 이미 보고된 폐암세포주 U2020에서 검출된 동형결실 영역에 포함된 것이었다²¹⁾(그림 5a). 또 신장세포암에서는 9p21에서 동형결실 영역이 검출되었고, 이를 상세하게 해석하여 p15 및 p16 유전자²²⁾가 결실되어 있음을 확인하였다(그림 5b). 이처럼 기지의 암억제유전자 또는 그 후보영역을 검출할 수 있었기에 RDA법은 암억제유전자좌를 상세하게 결정하기 위한 유력한 방법으로 활용될 수 있다. 한편 변이산물을 얻지 못한 경우 그 원인으로는 이형성병변(dysplasia) 등의 전암병변에서는 DNA 변이가 일어나지 않았고 또 정상세포가 종양검체에 혼입하였다는 것을 들 수 있다. 다시 말하여 종양조직의 DNA를 조제할 때에는 세심한 주의가 필요하다. 또 세포로서는 정상부위가 혼입되지 않게 잘 분획한 종양, 종양세포주, sorting 세포, nude mouse에 이식한 종양 등을 사용하는 것이 좋다. 또 남성유래의 종양은 Y염색체가 비특이적으로 탈락되기 쉬우므로 유의해야 한다.

▶맺음말

Genome science의 급격한 진전 특히 유전자 지도나 cDNA sequencing 분야의 비약적인 진보로 사람의 다양한 질환에 있어 그 원인이 되는 유전적 이상을 발견할 수 있었다. 금후 수년은 positional candidate cloning 방법에 의해 암유전자 해석이 진행되리라고 여겨진다. 그 중에서도 RDA법은 유전자좌의 positioning에 유용하고 범용성이 높은 기술이다. 또 RNA 수준에서의 변화 해석에도 응용함으로써²³⁾ Differential Display법(DDA)과 동일하게 이용할 수 있다.



참고문헌

- 1) Welsh, J., McClelland, M. : *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213-7218 (1990)
- 2) Welsh, J., McClelland, M. : in *The polymerase chain reaction* (ed. Mullis, K. B., Ferrè, F., Gibbs, R. A.), pp. 295-304, Birchaüser, Boston (1994)
- 3) Sorbral, B. W. S., Honeycutt, R. J. : in *The polymerase chain reaction* (ed. Mullis, K. B., Ferrè, F., Gibbs, R. A.), pp. 304-319, Birchaüser, Boston (1994)
- 4) Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M. : *Nature*, **363**, 558-561 (1993)
- 5) Kohno, T., Morishita, K., Takano, H., Shapiro, D. N., Yokota, J. : *Oncogene*, **9**, 103-108 (1994)
- 6) Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., Perucho, M. : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 10065-10069 (1992)
- 7) Kubota, Y., Shimada, A., Shima, A. : *Mutation Research*, **283**, 263-270 (1992)
- 8) Perucho, M., Welsh, J., Peinado, M. A., Ionov, Y., McClelland, M. : in *Methods in Enzymology*, **254**, pp. 275-290, Academic Press, Orland (1995)
- 9) Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. : *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6531-6535 (1990)
- 10) Siebert, P. D., Larrick, J. W. : *Nature*, **359**, 557-558 (1992)
- 11) Schierwater, B., Ender, A. : *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4647-4648 (1993)
- 12) Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., Gelfand, D. H. : *PCR Methods & Applications*, **2**, 275-287 (1993)
- 13) Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M. : *Science*,

- 259**, 946-951 (1993)
- 14) Lisitsyn, N. A. : *Trend in Genet.*, **11**, 303-307 (1995)
 - 15) Jonsson, J., Weissman, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 83-85 (1995)
 - 16) Rosenberg, M., Przybylska, M., Straus, D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6113-6117 (1994)
 - 17) Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M., Culpepper, J., Knowles, D., Moore, P. : *Science*, **266**, 1865-1869 (1994)
 - 18) Lisitsyn, N., Segre, J., Kusumi, K., Lisitsyn, N., Nadeau, J., Frankel, W., Wigler, M., Lander, E. : *Nature Genet.*, **6**, 57-63 (1994)
 - 19) Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Dalbagni, G., Barker, P., Sanchez, C., Gnarr, J., Linehan, W., Reid, B., Wigler, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 151-155 (1995)
 - 20) Schutte, M., Da Costa, L., Hahn, S., Moskaluk, C., Hoque, A., Rozenblum, E., Weinstein, C., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Yeo, C., Hruban, R., Kern, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5950-5954 (1995)
 - 21) Drabkin, J., Mendez, M., Rabbitts, P., Varkony, T., Bergh, J., Schlessinger, J., Erickson, P., Gemmill, R. : *Genes Chromosomes Cancer*, **5**, 67-74 (1992)
 - 22) Kamb, A., Gruis, N., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S., Stockert, E., Day, R. R., Johnson, B., Skolnick, M. : *Science*, **264**, 436-440 (1994)
 - 23) Hubank, M., Schatz, D. : *Nucl. Acid. Res.*, **22**, 5640-5648 (1994)

STS의 해석

다형성 DNA marker 로 RFLP 또는 VNTR 기법을 이용하였으나 최근에는 다수의 유전자에 대하여 PCR로 간단히 typing 할 수 있는 microsatellite marker를 활용하고 있다. 현재 사람의 전체 genome에서 3000개 이상의 microsatellite marker가 분리 및 등록되었다. 그 유전자의 좌위는 STS(sequence tagged site)로 결정하여 YAC clone의 인접지도 등의 물리 지도 작성에 이용한다. 모든 microsatellite marker의 정보는 인터넷상의 GDB등에서 얻을 수 있다. Microsatellite marker의 이용은 computer 통신과 PCR로 대표되는 분자유전학이 공동으로 발전하였음을 보여주는 좋은 예이다.

단백질 marker를 주로 이용하였던 다형성 유전자 marker가 12~13년 전에 DNA marker로 대체되었다. 또 최근에는 RFLP, VNTR법 대신 대립유전자가 많고 PCR로 간단히 typing할 수 있는 microsatellite marker를 많이 이용하는 추세이다. 1992년 프랑스의 CEPH와 Genethon 등의 그룹은 전체 genome에서 3000개 이상의 microsatellite를 분리한 뒤, 그 유전자 좌위를 결정하여 STS(sequence tagged site)로 등록하였으며¹⁾ STS는 전 genome의 염기서열을 결정하는 기준점 또한 동 연구그룹은 평균 0.9 Mb의 사람 genome을 삽입부분으로 가지는 YAC clone으로 전체 90% 이상의 인접지도를 완성하였다²⁾. Microsatellite marker는 유전자 지도 작성과 유전성 질환의 해석에 있어 아주 유용한 최적의 유전자 marker로 확립되었다³⁾. 본 고에서는 microsatellite marker의 현황에 대하여 설명한다.

1. Microsatellite Marker란

Microsatellite marker를 포함하여 다형성 DNA marker는 아래와 같이 분류할 수 있다.

(1) 1개의 염기가 치환된 것

A. RFLP(restriction fragment length polymorphism)⁴⁾

각 개인으로부터 추출한 고분자 DNA를 제한효소로 절단하여, 임의의 DNA probe와 hybridization하였을 때 나타나는 절단길이의 다양성(=restriction fragment length polymorphism)이다. 점돌연변이이므로 대립유전자가 2개인 경우가 많고 특정 개인이 heterozygote로 되는 빈도가 0.5전후로 낮아진다. 최근에는 PCR로 목적하는 영역을 증폭하여 PCR 산물중의 점돌연변이의 존재 유무를 제한효소로 확인하는 PCR-RFLP법이 행해지고 있다. 이 방법은 PCR를 사용하므로 southern hybridization과 같이 대량의 DNA를 소비하지 않아도 된다.

(2) 염기가 삽입/결실된 것

A. VNTR(variable number of tandem repeat) Minisatellite Marker⁵⁾

1 단위가 7~10개의 염기(bp)로 이루어진 짧은 단위의 반복수에 변이가 존재하여 발생하는 다형성이다. 대립유전자의 수가 많지만, 그 분포는 염색체상의 말단쪽에 편중되어 있다. 이 다형의 일부는 반복서열의 전후를 PCR로 증폭하여, PCR 산물의 길이 다형성으로 검출할 수 있다.

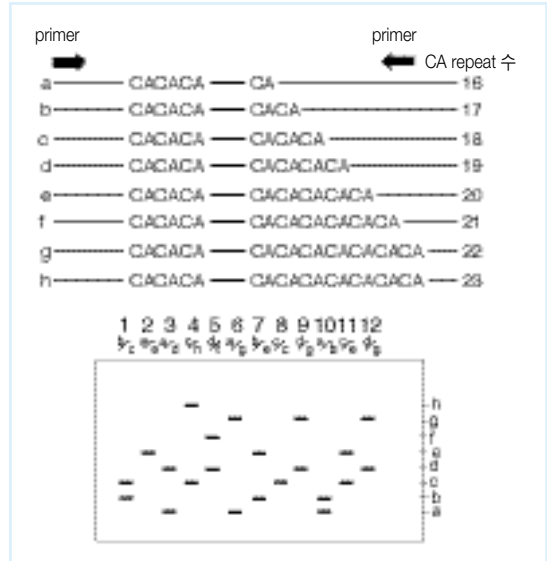


그림 1 Microsatellite marker의 모식도

Nucleotide repeat의 경우.

B. Microsatellite Marker⁶⁾

한 단위가 7 bp 까지로 이루어진 단위가 반복하는 다형으로, 대립유전자의 수도 많고 개인이 heterozygote가 되는 비율이 80~90%가 되는 marker가 많이 보고되어 있다. 그림 1에 나타낸 (CA)_n 등의 dinucleotide 반복서열은 genome내에 5~10만 copy로 그 다형성이 풍부하다. PCR을 이용하므로 시료로 사용하는 고분자 DNA는 소량으로도 충분하다. 이미 몇몇 기업들은 전 염색체 상에 균등하게 분포하는 microsatellite 다형 세트를 시판하고 있다. Microsatellite marker는 1 단위가 7 bp 까지의 반복서열로 존재하므로 mononucleotide(AAA등), dinucleotide(CA,TA,CG등), trinucleotide(CTG,CGG등), tetranucleotide(TAAA등), pentanucleotide등의 종류가 있지만 이중 CA 반복서열의 수가 많으므로 가장 많이 사용하고 있다.

C. 유전자 삽입/결실(I/D)에 의한 다형

수 bp~수백 bp의 유전자가 삽입 또는 결실되므로써 형성하는 것이다. 예를 들면 APOB(apolipoprotein B) 유전자의 signal peptide 에는 9 bp, ACE(angiotensin 변환효소) 유전자의 intron 16에는 약 300 bp 크기의 1개의 Alu 서열, MDPK(근긴장성 dystrophy의 원인유전자) 유전자의 intron 8에는 약 1,000 bp의 3개의 Alu 서열로 구

성된 유전자의 삽입 및 결실이 존재하여 병인유전자의 해석에 이용한다. 이들은 PCR로 증폭할 수 있다.

2. Microsatellite Marker의 정보

특정 염색체의 제한된 영역에 대한 지도를 작성하는 경우나, 어떤 유전병의 원인유전자를 해석하는 경우에는 어떤 DNA probe나 다형성 DNA marker가 필요한지의 정보를 얻는 것이 중요하다. 최근에는 인터넷으로 이용할 수 있는 GDB, CHLC, OMIM, Genethon 등이 유용하다. 여기에서는 유전병 정보(OMIM)이외에도 상세한 사람염색체지도, 다형을 나타내는 clone의 유전자 좌위 및 microsatellite marker의 경우, PCR primer의 염기서열, 반응조건 대립유전자의 길이와 유전자 빈도 등의 정보를 입수할 수 있다. *Nature*의 특별호(1995년 9월 28일 발행)에 "The Genome Directory"가 게재되었는데, 여기에는 상세한 염색체 지도가 기재되어 있다. 그러나 marker에 따라 동양인과 백인간에 유전자 빈도가 크게 다른 경우가 있음을 염두해 둘 필요가 있다⁷⁾. 게재한 대부분의 정보는 백인의 유전자 해석을 위해 개발한 DNA marker이기 때문에, 동양인의 해석에는 적용할 수 없는 경우도 있다.

표 1 DNA marker의 정보를 얻을 수 있는 대표적인 web site

| |
|--|
| GDB (Genome Data Base) http://www.gdb.org |
| 사람의 유전자지도와 유전자 좌위 정보 |
| OMIM (Online Mendelian Inheritance In Man) |
| 사람 유전병의 catalogue |
| CHLC (Cooperative Human Linkage Center) |
| http://www.chlc.org |
| genotype, 유전자 marker와 좌위 정보 |
| Genethon http://www.genethon.fr |
| 사람 CA 반복서열의 연쇄지도, 상세한 연쇄지도 정보 |
| Jackson Lab http://www.jax.org |
| 마우스의 유전자지도 정보 |
| Whitehead Institute http://www-genome.wi.mit.edu |
| 마우스의 CA 반복서열의 연쇄지도 |
| Research Genetics http://www.resgen.com |
| 사람과 마우스의 CA 반복서열이 전염색체에 균등하게 분포하는 세트를 map pair라 하여 시판하고 있다. |
| 통신으로 구입가능 |

3. Microsatellite Marker의 분리

특정 유전자 영역에서 microsatellite를 분리하기 위해서는 YAC clone의 경우 우선 cosmid clone으로 subcloning한다. 제작한 cosmid library를 CA oligonucleotide probe와 hybridization하여 CA 반복서열을 포함하는 cosmid를 분리한다. 이 cosmid를 *Sau3* AI 등의 제한효소로 절단하고, plasmid에 subcloning한 후 다시 CA oligonucleotide로 screening하여 CA를 포함하는 clone을 분리한다. 이 clone의 삽입 부분의 염기 서열을 결정하고, CA 반복서열을 가지는 적당한 primer를 제작하여 6명 정도의 건강한 시료를 이용하여 다형이 출현하는지의 여부를 확인한다. 이 방법의 단점은 plasmid의 삽입부분의 길이가 긴 경우에는 CA 반복서열을 끼고 있는 염기서열을 결정할 수 없으며 반대로 삽입부분의 길이가 짧은 경우에는 적당한 길이의 primer 염기서열을 결정할 수 없다는 것이다. CA 반복서열의 반복수가 14이상인 것은 다형성을 나타낼 확률이 높다^{8,9)}. Hayashi 등은 cosmid에서 직접 CA 반복서열의 전후 염기서열을 결정하는 방법으로서 6 종류의 sequence primer를 혼합하는 방법을 개발하였다¹⁰⁾.

4. Microsatellite Marker의 검출 방법

Microsatellite marker의 검출에는 RI 등으로 primer를 표식 하는 것이 일반적이다. 그러나 PCR 산물의 길이를 100 bp 전후로 하면 acrylamide gel로 전기영동한 후 EtBr로 염색만 함으로써, 나타나는 밴드가 heterozygote인지 homozygote인지를 구별할 수 있다. 그림 2의 (A)에 그 예를 나타내었다. 이 방법으로는 PCR 산물의 정확한 길이를 결정할 수는 없지만 hetero duplex가 되어 나타나는 밴드를 이용해서 heterozygote인지 homozygote인지는 구별할 수 있다. 일반적으로 한쪽의 primer를 ³²P로 표식하거나 FITC나 Rhodamin 등으로 형광표식을 하여 염기서열 결정용 전기영동으로 genotype을 결정한다. 그림 2의 (B)에는 Rhodamin 표식 primer를 사용한 예를 나타내었다. 이 STS는 사람 염색체를 현미경을 사용하여 절단한 genome 유래의 library로부터 분리한 microsatellite marker로, CEPH(프랑스 파리에 본부가 있으며 사람의 유전자 다형으로부터 유전자지도를 작성하는 기관) 가계를 typing한 예이다. GDB에 의해 D7S1682(MS8-148)로 명명되었고 국제적으로 등록되어 통용되고 있다¹¹⁾. 또 ³²P를 사용한 RI 표식 예를 지도 2의 (C)에 나타내었다. 이것은 웨르나 증후군의 원인 유전자를 분리 동정하기 위하여,

8S1055(MS8-134)를 이용하여 상동 집합성 mapping (homozygosity mapping)을 한 것이다. 3가계의 환자는 모두 N/N이나 G/G의 homozygosity를 보였다.

5. Microsatellite Marker의 응용

Microsatellite marker는 유전자지도 작성, 유전병 가계에 있어서의 연쇄 분석과 affected sib pair¹²⁾, 암억제 유전자의 해석에 있어서 heterozygosity의 소실 확인, 암조직 등에서의 DNA 복제시의 error(replication error:RER) 검출 등에 이용할 수 있다.

(1) 연쇄지도 작성과 연쇄 분석

생식세포가 감수분열할 때는 부계유래와 모계유래의 2개의 상동염색체사이에 교차(crossing over)가 발생하고 그 결과로 유전자의 재조합이 발생한다. 1회 감수분열로 전염색체의 약 30군데에서 교차가 발생한다. 재조합 빈도는 재조합율= θ 로 나타내는데, 2개의 유전자좌 거리가 멀어질수록 재조합(θ)은 커지는 반면, 가까이 좌위할 경우는 연쇄해 있어 재조합율은 거의 0이 된다. 동일한 염색체상에서 2개의 유전자좌가 어느 정도 떨어지면 좌위간의 교차는 2회 이상이 되고, 홀수회와 짝수회의 빈도는 동일하기 때문에

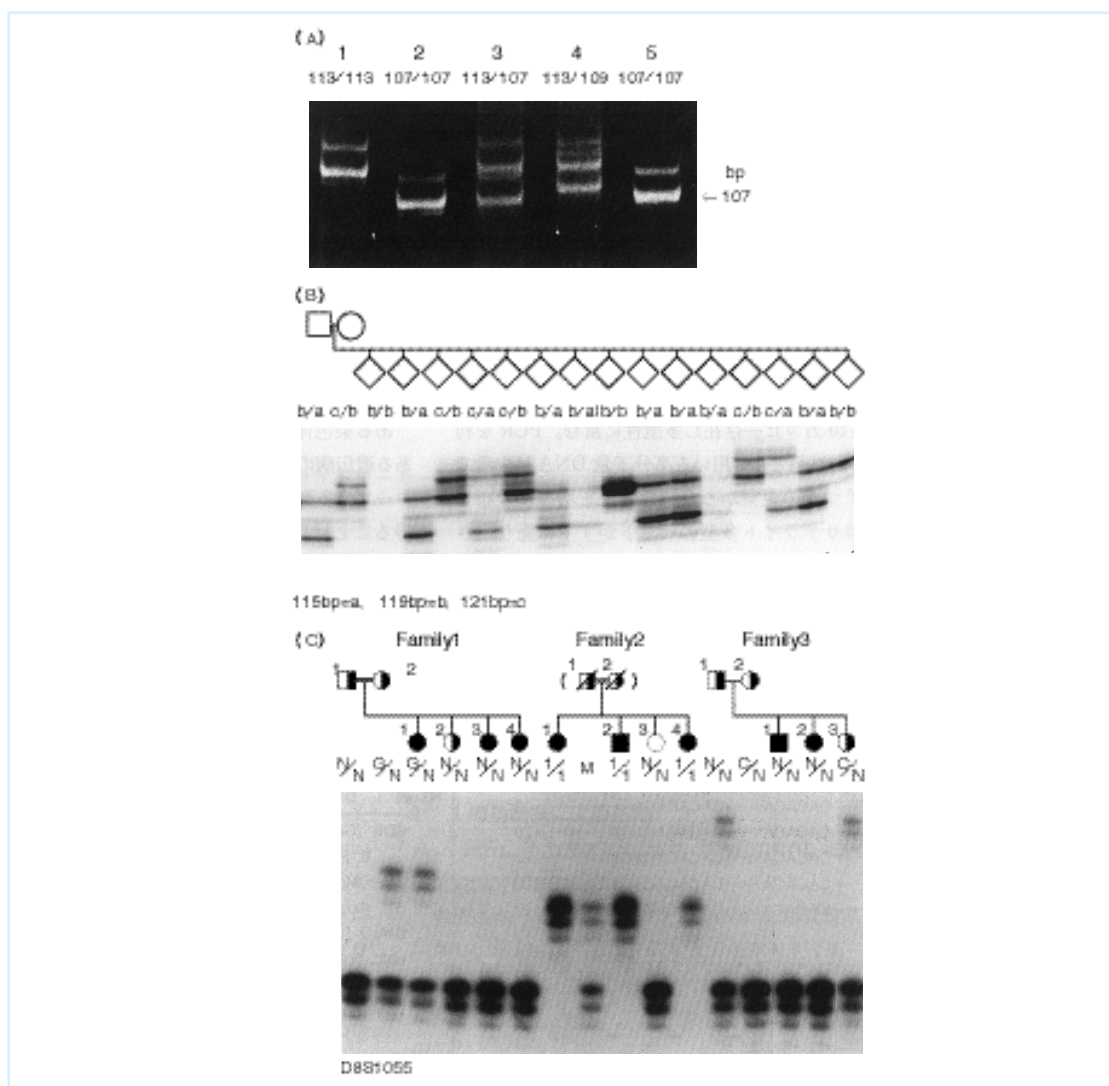


그림 2 Microsatellite marker의 검출법

(A) ANK 1 유전자의 다형을 10% polyacrylamide gel로 전기영동하고 염색하였다. Homozygote와 heterozygote를 구별할 수 있다(Nucl Acids Res., 19, 969, 1991). (B) D7S1682를 CEPH 가계(=1423)로 typing하였다. FMBIO100 사용. (C) D8S1055를 사용하여 웨르나 증후군가계를 해석하였다. ³²P 사용.

재조합율은 $0.5=1/2$ 이 된다. 또 2개의 유전자좌가 각각의 염색체상에 존재하는 경우도 동일 생식세포에서 분리될 확률은 0.5가 되어 재조합율은 0.5가 된다. 2개의 유전자좌의 지도 거리(map distance)= X 와 재조합율= θ 의 관계가 연쇄 분석의 기본이다. 동일 염색체의 2 유전자좌 사이에 1회의 교차만 발생하는 경우의 유전자 거리는 $X=\theta$ 로 정의한다. X 는 Centi Morgan(cM)이라는 단위로 표시한다.

사람의 유전자 지도는 genome상에 존재하는 유전자 marker에 따라 제작하며 지도의 길이는 남자의 경우는 27.5 M으로, 여자의 경우는 38.5 M으로 추정한다. 그 평균값은 $33\text{ M}=3,300\text{ cM}$ 이다. 사람의 genome은 haploid 당 평균 3×10^9 염기대를 가지므로 1 cM은 평균 $3 \times 10^9 \text{ bp}/3,300=1,000\text{ kb}$ 가 된다. 초파리와 쥐는 계획적인 교배로 유전자 지도를 작성하지만, 사람의 경우는 가계를 통계학적으로 처리하는 연쇄분석으로 연쇄지도도를 작성한다. Rod 값은 각 핵가족마다 가산된다. Rod 값의 합계가 +3 이상이면 양유전자의 좌위 사이에는 연쇄가 존재한다고 판정하고, rod 값의 합계가 -2이하이면 연쇄가 없고, -2에서 +3 사이이면 판정이 불가능하므로 다수의 데이터를 필요로 한다. 실제 rod 값의 산출에는 computer program인 "LIPED" 또는 "LINKAGE"를 사용하는 경우가 많다. 일반적으로 최대의 rod 득점(Z_{\max})을 나타내는 재조합율(θ_{\max})이 2개의 유전자 간의 거리가 된다.

(2) Affected Sib Pair Method)

Affected sib pair법에서는 연쇄분석처럼 2~3세대에 걸친 대가계 구성원의 시료를 모을 필요없이 발병한 2인의 동일세포와 양친의 시료를 모으기만 하면 된다. 또한 이 분석법은 질환 유전형식(우성유전인지 열성유전인지)나 침투율(연쇄분석법은 rod 값을 산출할 때 중요하다)를 고려할 필요가 없다는 장점을 가진다. 이 분석법에 적당한 유전자 marker는 대립유전자가 많은 HLA 항원이나 Gm형 등이며, ABO 혈액형이나 점돌연변이에 의한 RFLP는 대립유전자가 2~3 종에 이르므로 이 분석을 사용하더라도 정확한 정보를 얻기 힘들다. PCR을 이용한 microsatellite marker는 affected sib pair법을 해석하기 위하여 개발한 것이라고 해도 과언은 아니다. 실제 응용례로 자기면역질환인 바세도우병의 2개의 원인유전자 좌위인 HLA 좌위와 Gm좌위는 본 방법으로 결정되었으며, 모두 열성유전임을 확인하였다. 또 동시에 원인유전자의 유전자 빈도도 추정

하였는데, 이것은 역학 조사결과와 완전히 일치하였다. 금후 이 방법을 이용한 성인병의 해석을 시작할 것이다.

(3) 질환을 가진 집단의 해석

어떤 질환의 발증 원인이 되는 유전자 변이부위와 인접하는 유전자 marker는 연쇄 불평형 상태가 되는 원리를 이용한 것이다. 질환을 가진 집단과 정상 집단 사이의 유전자 빈도를 비교하고 통계학적인 검도를 한다. 주효과유전자가 1~수개 존재한다고 가정하고 원인 유전자를 검색하는 경우, 우선 환자군과 대상군 사이에서 임의의 유전자 marker의 유전자 빈도를 비교해 환자군에 편중하는지의 여부를 χ^2 검정 등을 이용하여 비교한다(관련의 검출). 이 유전자빈도의 편중은 원인유전자 좌위와 조사한 유전자 marker와의 사이에 연쇄 불균형이 발생하였음을 의미한다. 그 다음 관련검출된 유전자 marker에 대하여 그것이 주효과 유전자인가를 검토하기 위해, affected sib pair법 또는 연쇄 분석법으로 재해석한다.

오래전부터 ABO 혈액형의 질병과의 연관성에 관한 많은 논문이 발표되었다. 예를 들면, O형 혈액형을 가진 사람은 소화성 궤양에 걸릴 빈도가 높다는 보고나, HLA type의 만성 관절 류머티즘 질환과의 관련을 보고한 예가 그것이다. 여기서는 환자군과 대상군 집단간의 유전자빈도를 비교하기 때문에, 환자군의 질병 진단 기준을 명확히 할 필요가 있다. 관련 유의성의 검정에는 χ^2 검정을 사용하고 대상군의 인원수가 환자군과 동일하면 이상적이지만, 많어도 4배까지로 한다. 대상군의 인원수가 너무 많으면 χ^2 값이 커져 정확한 검정을 할 수 없다. 또 2×2 분할표의 기대도수가 5이하인 세포가 존재하는 경우에는, χ^2 검정을 이용하면 확률이 약간 낮은것으로 계산되어 버리므로 Fisher의 직접 확률계산법을 이용할 필요가 있다.

▶맺음말

DNA marker는 PCR에 의한 microsatellite marker의 출현으로 크게 변화하였고, 이에 편승하여 Genome Project도 비약적으로 진보하였다. 우선 microsatellite marker를 이용한 연쇄분석과 관련 연구로 염색체상의 유전자좌위를 결정하는 일을 제 1단계로 한다. 다음에는 발현을 확인하고, 다시 유전자좌위도 결정된 ESTs(expressed sequence tags)로부터 책임유전자 그 자체를 분리 동정하는 positional candidate approach가 주류를 이루게 될 것이다.¹³⁾



참고문헌

- 1) Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., Lathrop, M. : *Nature*, **359**, 794-801 (1992)
- 2) Cohen, D., Chumakov, I., Weissenbach, J. : *Nature*, **366**, 698-701 (1993)
- 3) Miki Tetsuro 등 : 일본 임상 1994년 특별호 「임상 분자 생물학」, 488-495 (1994)
- 4) Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davies, R. W. : *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314-331 (1980)
- 5) Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. : *Science*, **235**, 1616-1622 (1987)
- 6) Weber, J. L., May, P. E. : *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 388-396 (1989)
- 7) Kamino, K., Nakura, J., Kihara, K., Ye, L., Nagano, K., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Miki, T., Ogihara, T. : *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 407-419 (1993)
- 8) Nagano, K., Nakura, J., Kihara, K., Ye, L., Kamino, K., Mitsuda, N., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Miki, T., Ogihara, T. : *Jpn. J. Hum. Genet.*, **38**, 393-399 (1993)
- 9) Ye, L., Nakura, J., Mitsuda, N., Fujioka, Y., Kamino, K., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Miki, T., Ogihara, T. : *Genomics*, **28**, 566-569 (1995)
- 10) Iizuka, M., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, **3**, 171-173 (1991)
- 11) Nakura, J., Ye, L., Miki, T., Mitsuda, N., Ogihara, T., Takahashi-Fujii, A., Ishino, Y. : *Jpn. J. Hum. Genet.*, **39**, 447-449 (1994)
- 12) Yasuda Tokuichi : 일본 의사회 잡지, **89**, 563-572 (1983)
- 13) Collins, F. S. : *Nature Genet.*, **9**, 347-350 (1995)

in situ PCR

In situ PCR은 종래의 *in situ* hybridization이 가지는 세포 수준에서의 해석력과 PCR의 고감도성을 겸비한 기술이다. 이 기술로 단일 또는 극히 적은 copy수의 유전자를 검출할 수 있다. 여기서는 *in situ* PCR법의 원리 및 문제점을 소개함과 동시에 분자생물학에의 응용에 관하여 소개한다.

in situ hybridization이 가지는 세포 수준에서의 유전자 해석력에 PCR이 갖는 고감도성을 가미함으로써 *in situ* PCR이라는 새로운 기술이 탄생했다(그림 1).^{2,3)} 종래의 *in situ* hybridization에 의한 검출에서는 세포에 따라 10~20 copy의 target 유전자 서열이 필요하였다. 그런데 최근 주목을 받고 있는 AIDS(후천성 면역결핍증)의 원인인 HIV(human immunodeficiency virus) 등의 retrovirus는 감염후에 세포내에 존재하는 HIV genome의 copy수가 극히 적어 종래의 *in situ* hybridization으로는 검출이 불가능하였다. 따라서 조기 진단과 치료를 위해서는 고감도의 검출방법이 필요하고, *in situ* PCR에 의한 증폭으로 1개 또는 copy수가 적은 유전자서열의 검출도 가능해 졌다. 이 기술은 앞으로 병리학뿐만 아니라 분자생물학의 여러 분야에도 응용 되리라는 것은 의심할 여지가 없다. 본 고에서는 *in situ* PCR 기술의 원리를 소개함과 동시에 그 문제점 및 응용의 장래성에 대해 서술한다.

1. *in situ* PCR의 원리 및 방법

in situ PCR은 고정된 세포 또는 조직의 절편상에서 PCR을 하는 것이다. Target 유전자 서열을 증폭한 후에는 *in situ* hybridization(간접법)을 하거나 또는 PCR 중에 유입한 표식된 염기를 항체법(직접법)을 이용하여 검출한다. 그림 1은 slide glass 상에서 *in situ* PCR을 실시하는 과정을 나타낸 것이다. 이 밖에 tube내에서 PCR을 한 후에 형광 표식을 이용하여 flowcytometry로 검출하는 방법도 있다⁴⁾.

(1) 시료의 제작

A. 고정

세포나 조직의 형태 보존을 위하여 여러가지 고정액을 이

용하고 있다. 일반적으로 널리 이용하는 고정액은 cross-link계의 paraformaldehyde(1~4%)와 10% 완충 formalin액 이다. 이외에 crosslink계(alcohol, acetate, acetone도 이용되고 있다) 중에서는 STF(STrecK, fixative)를 사용하기도 한다⁴⁾. *in situ* PCR에 부적당한 고정액으로는 pyrric acid를 함유하는 고정액 외에 철 또는 수은 등의 중금속을 함유하는 것들을 들 수 있다. 고정 시간은 시료의 크기와 종류에 따라 다르다. 예를 들어 배양세포에서는 단시간(20분 정도) 고정시키는 경우와 8~24시간 또는 장시간 고정하는 경우가 있고, 조직표본의 경우는 1~수일간 고정할 필요가 있다. 연구자에 따라 시료를 제작하는 방법에는 상당한 차이가 있다⁵⁾. 단, 장시간 고정시킬 경우에는 PCR 시약이나 primer가 세포내의 주형에 침투할 수 있도록 효소로 전처리 해 주는 것이 좋다⁶⁾.

B. Protease 분해

단시간 고정하는 경우에는 protease 분해가 반드시 필요한 것은 아니지만 장시간 고정하는 경우에는 필요하다. 여기에서는 proteinase K, pepsin, trypsin 등을 흔히 사용한다. 분해에 필요한 시간은 고정시간에 비례한다. Protease의 농도 또는 분해시간을 변화시켜, 시료마다 최적조건을 검토할 필요가 있다. 고정과 분해의 최적화가 *in situ* PCR의 성공여부를 결정한다⁶⁾. 분해가 충분히 일어나지 않으면 Taq polymerase나 표식물질을 함유하는 기타 시약이 세포내의 DNA에 도달할 수 없다. 그러나 그림 2에서 나타낸 것처럼 amplicon이 작은 경우에는 과잉 분해되면 증폭된 DNA가 세포 밖으로 유출해 버린다(그림 2 참조). 시약 중의 primer, 염기, 효소를 침투하면서 그보다 크게 증폭된 DNA를 유출시키지 않도록 하는 것은 상당한 경험 필요하다.

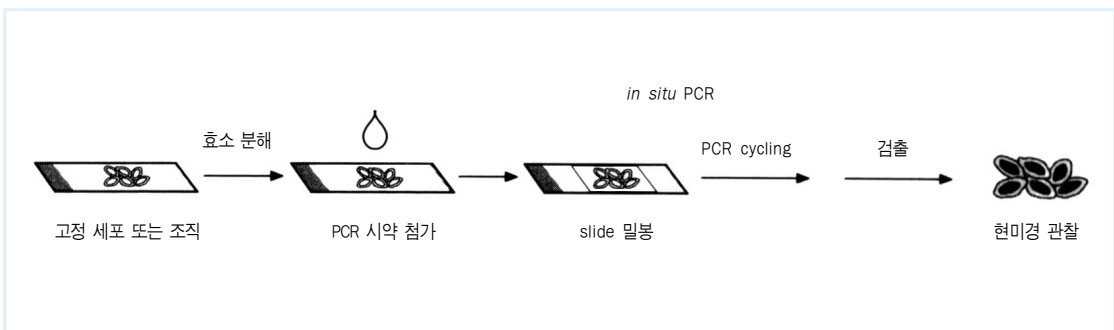


그림 1 *in situ* PCR

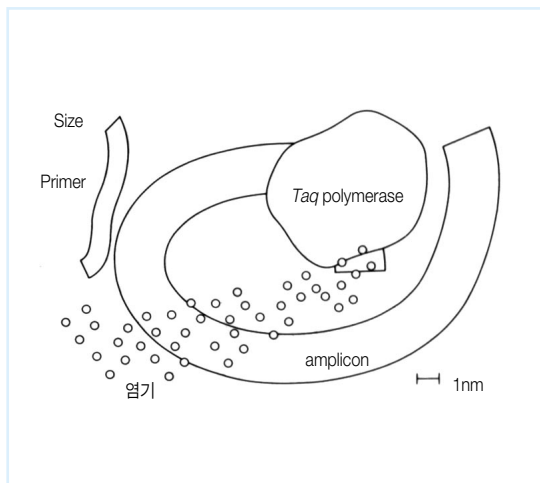


그림 2 증폭 서열과 PCR 시약의 크기 비교

(2) in situ PCR에 의한 증폭

A. 반응액과 PCR조건

Slide glass 상에 고정된 세포 또는 조직으로 PCR을 할 경우 액상 PCR과 같이 반응액의 최적화가 중요하다. 주형의 서열을 기준으로 몇 개의 primer를 만들어 시험해 보는 것이 좋다. 필자의 연구실에서는 $1 \times$ in situ PCR core buffer II (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2.5~4.5 mM $MgCl_2$, 200 μM 각 염기, 0.5 μM primer 와 10 U Taq polymerase를 섞어 사용한다. Glass slide 상에서 실시하는 in situ PCR은 plastic tube내에서 실시하는 액상 PCR과 여러가지 면에서 근본적인 차이점이 있다. 첫째, cover slip의 표면적과 체적 비율은 tube보다 약 10 배 더 크다. 따라서 효소나 magnesium이 glass의 표면에 비특이적으로 부착하여 소실될 가능성이 있다⁷⁾. 이를 고려하여 액상 PCR보다 많은 양의 효소를 첨가해 준다. 둘째, 세포의 용적은 tube보다 1/10,000 정도 작다. 이론

적으로는 단일 copy수의 유전자의 경우 액상 PCR보다 훨씬 적은 cycle 수(약 10회)로 검출할 수 있다(표 1 참조). 표 1에 나타난 것처럼 1 copy를 주형으로 한 경우 약 11회 cycle 동안 2,000 copy가 핵내에 축적된다. 이것은 hybridization으로 용이하게 검출할 수 있는 수이다. 그러나 실제로 in situ PCR에서는 액상 PCR 보다 낮은 증폭 효율을 가짐이 보고되었다¹²⁾.

Cycle 수를 늘리면 세포조직의 형태 보존성이 저하하고 증폭된 DNA가 세포밖으로 유출할 가능성이 있다. PCR 조건을 최적화하여 최소의 cycle수로 높은 효율로 증폭함이 중요하다.

셋째, 조직형태를 보존하기 위해 PCR 조건의 간소화가 필요하다. 일반적인 3단계(예를 들어, denaturation, annealing, extension)을 열변성 93℃ 10초, annealing 55℃ 1분(primer의 길이, GC함량 등을 디자인할 때 고려하는 것이 필요)의 2단계 반응으로 줄임으로써 전체적으로는 PCR의 소요시간을 단축하는 것이 좋다. 그러나 이 경우는 slide 전용의 thermal cycler가 필요하다.

B. PCR Thermal Cycler

Slide glass상에 PCR 시약을 첨가한 후, cover slip으로 절편을 덮는다. 열에 의한 시약의 증발을 막기 위해 메니큐어 또는 rubber cement 등으로 cover slip을 밀봉한다. 종래의 block방식의 cycler를 사용 할 경우 mineral oil을 이용하여 열전도를 개량할 필요가 있다.

C. 대조(Control)

PCR은 고감도이므로 매회 대조반응을 실시하는 것이 중요하다.

음성대조(negative control)의 예로서 다음과 같은 것을 들 수 있다.

① 1 쌍의 primer의 한쪽 부분만을 사용한다.

표 1 Plastic tube내와 세포내에서의 copy 수 비교

| | 직경 (μm) | 용적 (μm^3) | copy 수 ($1 \times 10^7 M$ 상당) | 1 copy를 주형으로 하는 경우 필요한 cycle 수 |
|--------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 세포질 | 9 | 348 | 20,961 | 15 |
| 핵 | 4 | 34 | 2,071 | 11 |
| 소핵 | 1 | 1 | 32 | 5 |
| plastic tube | 4.6 mm | 50 μl | 3×10^{12} | 42 |

- ② 효소를 첨가하지 않는다.
- ③ 아무 관련 없는 primer을 사용한다.
- ④ Primer 없이 한다.
- ⑤ Target DNA 또는 RNA를 함유하지 않은 조직을 사용한다.
- ⑥ mRNA가 target인 경우 RNase 또는 DNase를 처리한다. Positive control의 예로서는 다음과 같은 것을 들 수 있다.
- ⑦ Target DNA나 RNA를 다량 함유한 조직을 사용한다.
- ⑧ 시료 제작과 분해에 성공하였는지 여부는 사람조직의

경우 Alu 서열¹⁾이나 핵내에 다수의 copy가 존재하는 서열을 증폭한다.

(3) 검출방법

검출방법에는 간접법(*in situ* hybridization)과 직접법(표식한 염기 또는 primer을 이용하여 PCR로 증폭한다)이 있다. 직접법은 간접법에 비하여 비특이적으로 유입된 표식으로 인해 noise가 많은 것이 문제이다. 시료의 제작방법 특히 고정 방법에 따라 signal과 noise의 비를 조절할

표 2 *in situ* PCR 응용

| 표적 | 시료 | 검출법 | 연구자(문헌) |
|--|--------------------|-----|---------------------|
| A. 외래성 | | | |
| Lentivirus DNA | 양 맥락망상세포 | 간접 | Haase 등(3) |
| HPV DNA | 사람자궁경 조직 | 간접 | Nuovo 등(15) |
| | SiHa 세포 | 직접 | Zehbe 등(16) |
| | Caski, SiHa 세포 | 간접 | O'Leary 등(14) |
| HIV-1 DNA | SUP-T1세포 | 간접 | Begasra 등(2) |
| | HUT78 세포 | 직접 | Spann 등(17) |
| | 백혈구 | 직접 | Nuovo 등(18) |
| | 단핵구 | 간접 | Bagasra 등(19, 20) |
| | 임파구, 임파절 | 간접 | Embretson 등(21, 22) |
| HIV-1 mRNA | 뇌세포, T세포 | 간접 | Patterson 등(4) |
| 유종양 virus DNA | 유선조직 | 간접 | Chiu 등(23) |
| C 형 간염 virus RNA | 간장조직 | 직접 | Nuovo 등(24) |
| CMV DNA ^{a)} | MRC5 세포 | 간접 | Komminoth 등(10) |
| | 폐조직 | 간접 | Long 등(25) |
| B형 간염 virus DNA | 간장조직 | 간접 | Long 등(25) |
| <i>Helicobacter pylori</i> ^{b)} | 소화기관 | 직접 | Lewis 등(사신) |
| B. 내인성 | | | |
| VH ^{c)} 유전자 전위 DNA | 혈액 | 간접 | Komminoth 등(10) |
| VH mRNA | Mouse hybridoma 세포 | 간접 | Embleon 등(26) |
| 염색체의 전좌 | Hybridoma 세포 | 간접 | Long 등(25) |
| 염색체 mapping | 중기 염색체 | 직접 | Gosden 등(27) |
| 뇌성장요인 RNA | 뇌조직 | 직접 | Staecker 등(28) |
| 포포린 RNA | 임파구 | 직접 | Chen 등(29) |
| EGP receptor RNA | 표피조직 | 직접 | Heniford 등(30) |
| p53 암유전자 | 암종양 세포 | 직접 | Pestaner 등(31) |
| 억제인자 | | | |

a) Cytomegalo virus(CMV), b) *Helicobacter pylori*; 세균의 일종, c) VH immunoglobulin의 heavy chain의 가변영역

수 있다는 학설도 있다. 영국 Leed 대학의 Lewis 박사는 microwave oven을 이용하여 특수한 고정법을 실시하는 직접검출법을 사용하고 있다. 미국 뉴욕시립대의 Nuovo 교수는 Taq polymerase 효소는 수복능력을 가지고 있으며, 이 작용에 의해 genome DNA의 GAP이나 절단된 곳이 수복될 때 비특이적으로 표식한 염기를 incorporation 하는데 이것이 noise의 원인이 된다고 하였다. 모든 genome DNA를 DNase로 처리하면 RT-PCR의 경우에는 직접법을 이용할 수 있다⁶⁾. 그러나 일반적으로는 간접법이 신뢰성이 있다. Hybridization의 probe로서는 biotin, digoxigenin²⁾ 등을 이용한 비방사성 동위원소계를 추천한다. Probe는 안정하여 몇 개월동안 냉동실에 보존할 수 있을 뿐만 아니라 signal의 고감도성과 해상력도 방사성 동위원소보다 우수하고, 취급면에서도 안전하고 신속하다.

(4) in situ PCR법의 현재 상황

in situ PCR법은 과거 5년간 몇몇 연구실에 의하여 개발되었다. 대상 유전자가 다를 뿐만 아니라 시료, 고정, PCR의 protocol을 비교하여도 두가지 이상 같은 것이 없다. 따라서 분자생물학분야에 사용되고 있는 “Molecular Cloning⁹⁾”과 같은 protocol 서적이 유감스럽게도 존재하지 않는다. in situ PCR을 할 때에는 많은 parameter를 고려해야 한다.

아래에 그 예를 들었다.

- ① 시료 (배양세포, 조직절편, cytospin 등)
- ② 유전자서열과 그 copy수(외래 또는 내재)
- ③ PCR primer(1 쌍 또는 복수쌍)
- ④ PCR Thermal Cycler
- ⑤ 증폭 profile
- ⑥ 시료의 고정(포르말린, 열, 알코올 등)
- ⑦ 시료의 protease 분해 처리
- ⑧ PCR 방법(tube 내, slide glass 상)
- ⑨ 검출방법(직접법과 간접법)
- ⑩ 적당한 control

위에서 설명한 바와 같이 그 방법이 복잡하기 때문에 초심 연구자는 좋은 결과를 얻기 위해 어느 정도의 인내력을 가져야 한다.

(5) in situ PCR의 문제점

PCR은 감도가 높기 때문에 적절한 control 실험을 행하지 않으면 신뢰할 만한 결과를 얻을 수 없다. False signal의 원인으로서 DNA의 확산 및 유실, DNA 수복과 내인성 priming(후술)을 들 수 있다^{10, 11)}. 유출에 의한 오염은 배양세포의 DNA가 인접세포내에 침투하여 false signal을 만드는 경우이다. 그러나 이 문제점은 세포의 고정과 효소 분해의 최적화, 증폭 cycle수의 감소에 의한 형태 보존으로 상당히 억제할 수 있다. 이 밖에 biotin¹⁰⁾, digoxigenin⁴⁾ 등을 PCR 반응에 첨가함으로써 PCR로 증폭된 DNA(amplicon)의 유실을 방지할 수 있다. Amplicon의 길이를 길게 함(400 bp에서 1 kb)으로써 유실을 억제할 수 있다^{3, 12)}. 직접적으로 표식한 염기를 이용하여 검출하는 경우 Taq polymerase 효소의 수복 기능에 의해 표식이 DNA 서열의 gap에 비특이적으로 유입되므로 noise가 높아진다. 이 밖에 내인성 DNA 또는 cDNA 단편이 primer가 되어 single strand에 표식을 유입하는 것을 “내인성 priming”이라 한다¹³⁾. 잘못된 음성결과를 유발하는 원인 중 한가지는 slide glass상에서 반응을 하기 때문에 PCR 증폭의 효율이 나빠진다는데 있다. 또 열전도성이 떨어지고 PCR 시약이 cover slip 아래에서 대류하기 어려운 점도 원인으로 들 수 있다. 이 밖에 DNA polymerase나 시약의 일부가 glass 표면에 비특이적으로 흡착하여 소실되어 버리기도 한다⁷⁾. PCR 증폭이 일어나지 않는 예로서는 시료에 효소활성을 억제하는 물질이 함유되어 있는 경우, 또는 시료의 분해정도가 부적당하여 DNA에 시약이 도달할 수 없는 경우이다. 반대로 과잉분해가 일어나면 amplicon이 세포밖으로 유출되어 signal을 전혀 볼 수가 없다⁶⁾.

(6) in situ PCR의 응용과 장래성

in situ PCR의 응용이 특히 기대되는 분야는 감염증의 진단, 예를 들어 HIV, HSV(herpes simplex virus), HPV(human papilloma virus) 등의 검출이다. 종래의 항체를 이용한 검출법에서는 감도가 너무 낮아 검출할 수 없을 정도의 virus도 이 기술에 의해 조기검출이 가능하게 되었다¹⁴⁾. 응용은 병리학에 한하지 않고 발생 및 유전학, 세포학, 법의학, 혈액학과 모든 생물학 분야에도 확대될 것이다. 지금까지의 연구는 동물세포가 대상이었기에, 아직 식물을 재료로 하는 protocol은 확립되지 않았지만 이것도 시간문제일 것이다.

▶ 맺음말

현재 시점에 있어서 *in situ* PCR은 기술적으로 여러 가지 문제점을 가진다. 장래에 개선이 기대되는 것은 시료 조제와 처리의 일반화이다. 기본적으로 고정과 분해의 문제이지만 여러 가지 세포나 조직에서의 경우를 protocol집으로 정리하는 것이 이상적일 것이다. 덧붙여 *in situ* PCR 전용으로 개발된 특별한 고정액이나 embedding용 재료가 판매되어 단 시간내에 시료의 준비가 가능해지길 바란다. 동결된 절편의 이용도 크게 연구될 것으로 기대된다. PCR 산물의 검출법도 형광 primer 또는 형광표식한 염기를 이용하여 동시에 복수의 유전자서열을 해석할 수 있을 것으로 기대된다. 한편 질환의 유전자 판단에서 특히 중요한 것은 정량적인 해석이다. 적당한 내부 control을 이용하여 외래성 virus의 DNA 또는 RNA를 정량적으로 검출할 수 있게 된다면 신뢰성있는 진단방법이 될 것이다. *in situ* PCR에서는 액상 PCR의 경우처럼 DNA를 추출하지 않고 실험을 하기 때문에 재료적인 면에서도 미량의 시료로도 충분하다. 장래에는 오히려 액상 PCR보다도 우수한 방법으로 모든 분야에 응용될 가능성도 있다. *in situ* PCR법이 분자생물학의 발전에 크게 공헌할 것을 바란다.



참고문헌

- 1) Saiki, R., Scarff, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. : *Science*, **230**, 1350-1354 (1985)
- 2) Bagasra, O. : *Amplifications*, **4**, 20-21 (1990)
- 3) Haase, A., Retzel, E., Staaskus, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4971-4975 (1990)
- 4) Patterson, B., Till, M., McBride, L., Wolinsky, S. : *Science*, **260**, 970-979 (1993)
- 5) Bagasra, O., Pomerantz, R. : *Clin. Lab. Med.*, **24**, 351-365 (1994)
- 6) Nuovo, G. : *PCR in situ hybridization, protocols and applications*, 2nd ed., Raven Press, N. Y. (1994)
- 7) Atwood, J., Nuovo, G. : in *PCR in situ hybridization*, pp.403-416, Raven Press, NY (1994)
- 8) Lewis, F., Holt, A., Cross, D., Quirke, P. : *J. Pathol.*, abstract : 171st Meeting of the Pathological Society of Great Britain and Ireland
- 9) Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (ed.) : *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)
- 10) Komminoth, P., Long, A., Ray, P., Wolfe, H. : *Deogn. Mol. Pathol.*, **1**, 85-97 (1992)
- 11) Sallstrom, J., Zehbe, I., Aleml, M., Wilander, E. : *Anticancer Res.*, **13**, 1153 (1993)
- 12) Retzel, E., Staskus, K., Embretson, J., Hasse, A. : in *PCR strategies* (ed. Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J.), pp.199-212, Academic Press, San Diego (1995)
- 13) Komminoth, P., Heitz, P., Long, A. : *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, **78**, 146-152 (1994)
- 14) O'leary, J., et al. : *J. Clin. Pathol.*, **47**, 933-938 (1994)
- 15) Nuovo, G., MacConnell, P., Forde, A., Deovenne, P. : *Am. J., Pathol.*, **139**, 847-854 (1991)
- 16) Zehbe, I., Hacker, G., Rylaner, E., : *Anticancer Res.*, **12**, 2165-2168 (1992)
- 17) Spann, W., Pachmann, K., Zabnienska, H., Pielmeier, A., Emmerich, B. : *Infection*, **19**, 242-244 (1991)
- 18) Nuovo, G., Margiotta, M., MacConnell, P., Becker, J. : *Diagn. Mol. Pathol.*, **1**, 98-102 (1992)
- 19) Bagasra, O., Hauptman, S., Lischner, H., Sachs, M., Pomerantz, R. : *N. Engl. j. Med.*, **326**, 1385-1391 (1992)
- 20) Bagasra, O., Seshnamma, T., Pomerantz, R. : *J. Immunol. Methods*, **158**, 131-145 (1993)
- 21) Embretson, J., Zupanic, M., Beneke, J., Till, M., Wolinsky, S., Ribas, J., Burke, A., Hasse, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 357-361 (1993 a)
- 22) Embretson, J., Zupanic, M., Ribas, J., Burke, A., Racz, P., Tennerracz, K., Haase, A. :

- Nature*, **362**, 359-362 (1993 b)
- 23) Chiu, K-P., Cohen, S., Morris, D., Jordan, G. : *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 333-341 (1992)
 - 24) Nuovo, G., Lidonnici, K., MacConnell, P., Lane, B. : *Am. J. Surg. Pathol.*, **17**, 683-690 (1993)
 - 25) Long, A., Komminoth, P., Wolfe, H. : *Histochem.*, **99**, 151-162 (1993)
 - 26) Embletin, M., Gorochoy, G., Jones, P., Winter, G : *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3831-3837 (1992)
 - 27) Gosden, J., Hanratty, D. : *Biotechniques*, **15**, 78-80 (1993)
 - 28) Staecker, H., Cammer, M., Rubinstein, R., Vandewater, T. : *Biotechniques*, **16**, 76-80 (1994)
 - 29) Chen, R., Fuggles, S. : *Am. J. Pathol.*, **143**, 1527-1534 (1993)
 - 30) Heniford, B., Shum-Siu, A., Leonberger, M., Hendler, F. : *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3159-3166 (1993)
 - 31) Pestaner, J., Bibbo, M., Bobroski, L., Seshamma, T., Bagasra, O. : *Acla Cyologica*, **38**, 676-680 (1994)
 - 32) Komminoth, P., Long, A. : *Virchows Archiv B Cell Pathol.*, **64**, 67-73 (1993)

in situ PCR

TaKaRa PCR Thermal Cycler

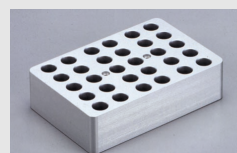
MP TP3000



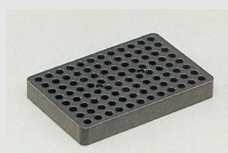
TP3000용 부속품 Sample block



Sample Block for
0.5 ml 54-well



Sample Block for
1.5 ml 30-well



Sample Block for
PCR Tube Plate



Sample Block for Slide
Glass(*in situ* PCR)

PCR을 이용한 미지 영역의 Cloning (I)

PCR은 기지서열의 일부를 primer로 제작하여 primer의 특이성으로 primer 사이의 영역을 증폭하는 방법이다.

PCR은 기지유전자의 cloning에 널리 이용하고 있으며 미지유전자의 cloning을 위한 여러 가지 방법이 고안되어 실용화되고 있다.

대표적인 미지 유전자의 cloning 방법으로 1) 3' -RACE법, 2) Degenerate PCR법, 3) AP-PCR법과 DD법, 4) 5' -RACE법 등이 있다.

본 고에서는 미지의 유전자를 cloning하는 기본적인 원리와 3' -RACE, degenerate법, DD법의 원리와 주의점에 대하여 소개한다.

1. 일반적인 주의사항

(1) Negative control을 만든다.

미지유전자의 cloning을 위한 PCR 대부분은 특정 유전자를 증폭하는 PCR보다 특이성이 낮아 비특이적 증폭이 많이 일어난다.

비특이적 증폭에서 특이적 증폭만을 구별하는 간단한 방법은 없지만 특이적 증폭이 아닌 것을 알 수 있는 방법은 있다. 즉 한쪽의 primer만으로 증폭되는 것은 비특이적 증폭이다. RACE법이나 degenerate PCR법을 이용하여 미지유전자를 분리하기 위해서는 반드시 양쪽의 primer 중 한쪽만을 포함하는 negative control을 두 종류 만들어 동시에 증폭하여 전기영동으로 비교해야 한다. 한쪽의 primer로 증폭이 되는 것은 비특이적 산물이며 negative control 실험은 특이적 산물을 선택할 수 있는 가장 간단한 방법이다. 흔히 PCR로 증폭산물을 subcloning하고 sequencing으로 확인하는데, sequencing 단계에서 양쪽에 같은 primer가 있음을 확인하며 처음부터 모든 실험을 다시 시작해야 하는 오류를 범하게 된다.

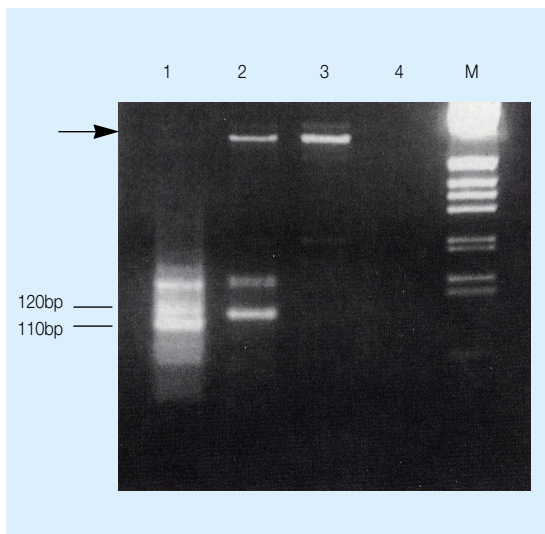


그림 1

lane 1 : 최초의 PCR(SP와 AP1로 증폭)

lane 2 : Sense, antisense 두 종류의 primer를 이용한 nested PCR(SP와 AP2로 증폭)

lane 3 : Sense primer(SP) control

lane 4 : Antisense primer(SP) control

비특이적 증폭은 흔히 한쪽의 primer만으로 증폭이 일어나는 경우이며, lane 3, 4와 같이 한쪽의 primer만을 포함하는 negative control의 PCR을 통하여 목적 밴드가 양쪽의 primer에서 증폭된 것을 확인한다.

그림 1과 같이 lane 3, 4는 lane 2에 대해 negative control로 한쪽 primer만을 사용하였다. 그림 1 왼쪽의 화살표로 표시된 분자량이 큰 밴드는 lane 2 뿐만 아니라 lane 3에서도 증폭됨을 알 수 있다. 다행히 목적 산물(110 bp)이 lane 2에서만 확인되었지만 만약 목적 산물의 크기가 화살표 위치였다면 그것을 cloning하여도 양쪽 끝에 같은 primer를 갖는 부분만 얻게 된다.

이와같이 비특이적인 background를 줄일 수 있으므로 적절히 선택하기를 바란다.

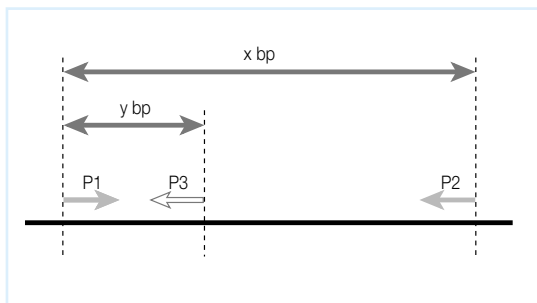


그림 2

(2) Size를 분획한다

PCR은 여러 종류의 DNA단편을 합성할 때 길이가 작을수록 증폭효율이 높은 경향이 있다. 또한 degenerate PCR과 같이 특이성이 낮은 primer로 PCR할 경우는 원하는 DNA와 다른 크기의 밴드만이 다량 증폭되는 경우도 가끔 있다. 이런 경우는 PCR산물을 전기영동한 다음 필요한 크기의 DNA만을 gel에서 추출한 후 주형으로 사용하여 다시 한번 PCR하는 것이 좋다.

그림 3은 한쪽의 nested primer를 이용하여 최종적으로 y bp 전후의 단편을 얻기 위하여 degenerate PCR 한 결과이다. 최초 PCR에서는 x bp 부근에 단편이 증폭될 것으로 예상했지만, 실제로는 y bp 부근에 강한 비특이적 밴드가 검출되었으며 예상했던 x bp 부근에는 극히 적은 양의 흐린 밴드를 확인하였다(그림 3 lane B).

최초 PCR에서 증폭된 비특이적 밴드는 primer P1을 양 끝에 갖는 구조이므로(그림 3 lane A) 단순히 nested PCR만으로 제거할 수 없고, 비특이적인 밴드만이 증폭되며 원하는 y bp 밴드는 증폭되지 않았다(그림 3 lane C). 그러나 최초 PCR생성물을 전기영동한 후 예상했던 x bp 전후의 DNA를 gel에서 잘라내어(그림 3 lane B) 정제하여 주형으로 사용한 nested PCR의 결과, 최초 PCR에서

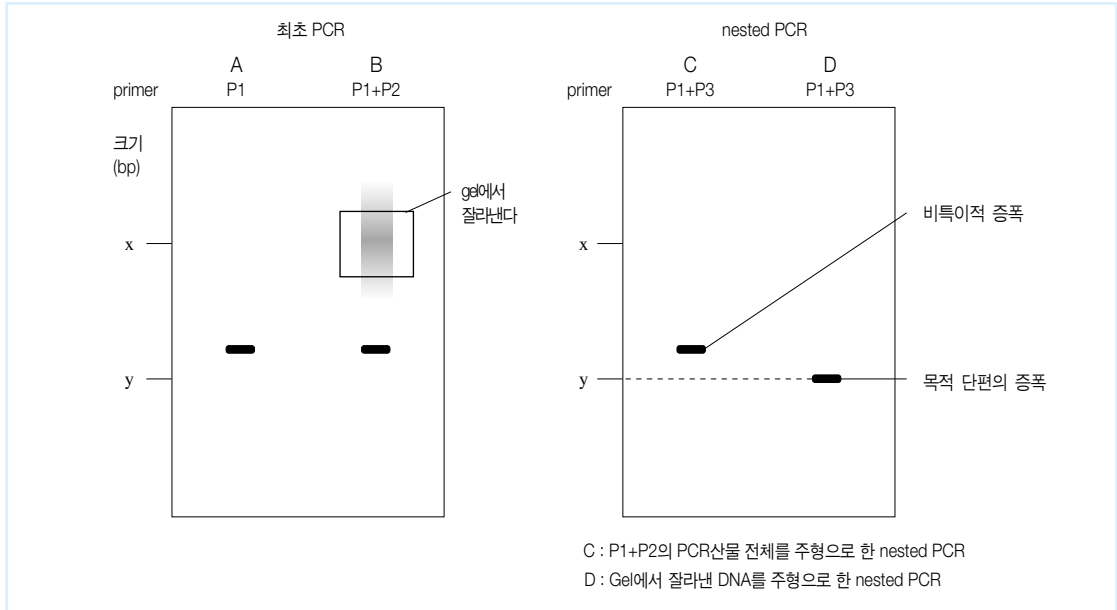


그림 3

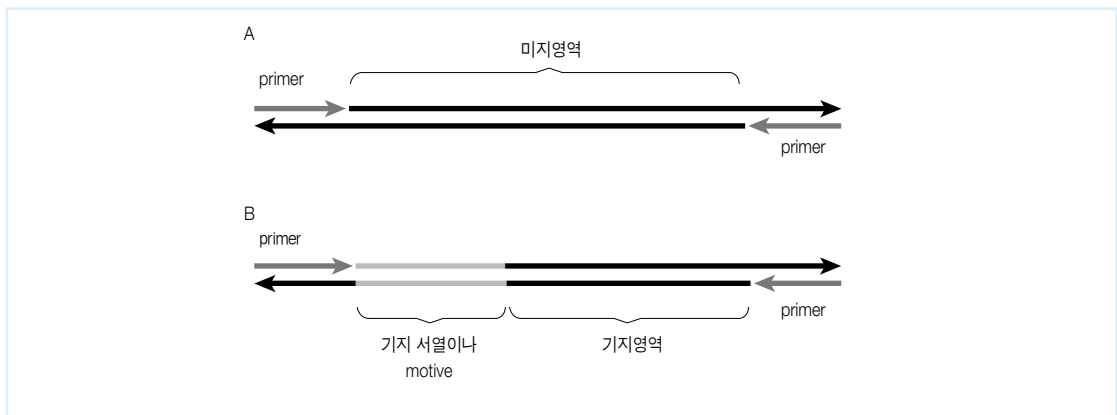


그림 4

증폭한 비특이적 산물이 제거되고 예상하는 band가 증폭되었다(그림 3 lane D).

(3) PCR 결과 얻어진 단편의 판정법을 갖는다.

PCR에서 미지영역을 cloning할 때는 얻어진 clone이 의미가 있는 것인지를 판단할 수 있는 방법이 있어야 한다. 그림 4의 A와 같이 primer 외에는 모두 미지의 서열인 경우는 증폭된 단편이 비특이적 산물인지 특이적 산물인지 판단하기 어렵다. RACE 법이나 degenerate PCR법으로 B와 같이 신장방향에 어느 정도 기저의 서열이 남도록 디자인하면 얻은 단편이 특이적 산물인지 비특이적 산물인지

확인할 수 있다.

물론 본질적으로 그림 4의 A와 같은 단편밖에 얻어지지 않는 AP-PCR과 같은 경우는 다른 분석방법이 있으므로 여기서는 언급하지 않겠다.

2. 3' - RACE법

(1) 3' - RACE법의 원리

RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)는 cDNA의 3' 말단을 부분적으로 알고 있는 경우 3' 말단의 염기서열 정보를 바탕으로 cDNA 말단까지 미지영역을

cloning하는 PCR 방법이다. 미지영역이 mRNA의 5' 인 경우를 5' -RACE, 3'의 경우를 3' -RACE라 한다. 그림 5에 3' -RACE법의 원리를 나타내었다.

5' 말단에 adaptor 서열*이 붙은 oligo(dT)를 primer로 사용하여 역전사 반응으로 1st strand cDNA를 합성한다. 완성된 1st strand cDNA 말단은 adaptor 서열을 포함하고 있으며 cloning을 목적으로 하는 cDNA는 미지영역이 기저서열과 adaptor 서열 사이에 끼어있게 된다. 기저서열의 일부를 sense primer로 사용하여 adaptor primer와 함께 PCR함으로써 미지영역을 증폭할 수 있다(이 sense primer를 유전자 특이적 primer, gene specific primer라는 의미로 GSP1이라고 줄여 쓰는 경우가 많다).

하지만 1단계 PCR에서 사용한 두 개의 primer 중 한 쪽

의 adaptor primer는 역전사반응으로 생성된 전 cDNA에 공통으로 존재하는 서열이므로 PCR 특이성은 GSP1에 의존적이다. 따라서 이 단계에서 얻어지는 생성물은 비특이적인 background가 많이 생기며 nested PCR로 background를 줄일 수 있다. GSP1의 downstream 기저서열에 목적 DNA에 특이적인 sense primer GSP2를 디자인하여 GSP2와 adaptor primer로 nested PCR하여 증폭한 단편을 subcloning하여 sequencing으로 확인한다.

* 1 제한효소의 인식서열이 붙어있는 것이 많아 linker 서열이라고 부르기도 한다. 또한 이 서열을 갖는 primer를 linker primer라 한다.

(2) 3' - RACE법의 주의점

① Adaptor primer에 대하여

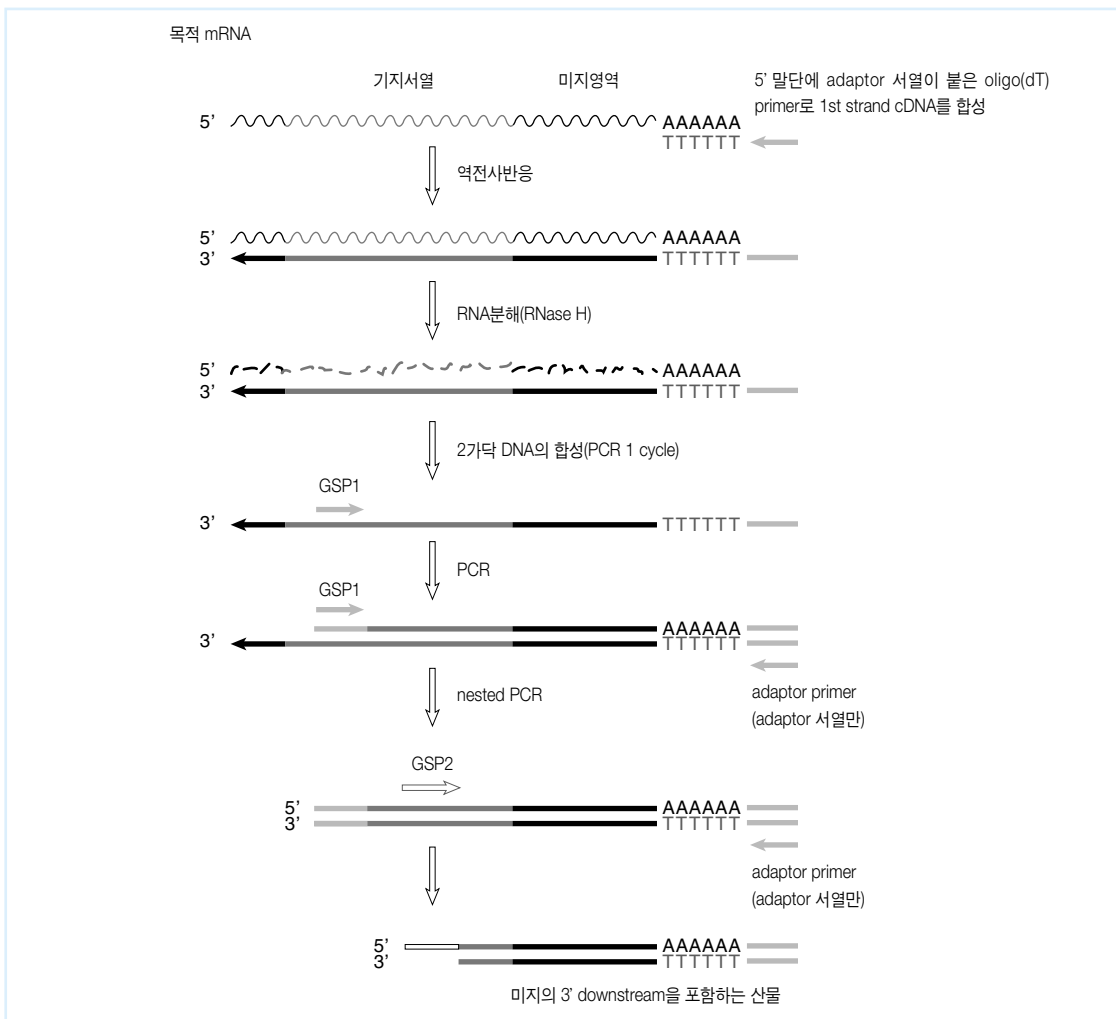
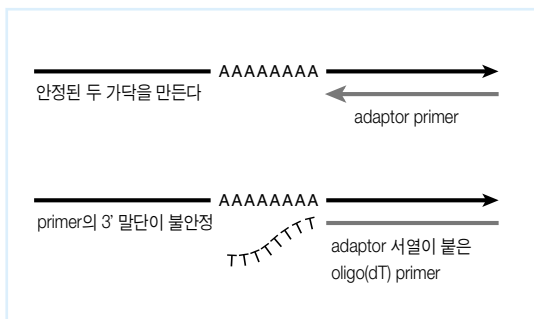


그림 5 3' - RACE의 원리

그림 5에서는 3'-RACE PCR에 사용하는 antisense primer로 1st strand cDNA의 합성에 이용하는 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer가 아닌 adaptor 서열 primer를 사용했는데, 이는 단순한 Tm 계산상으로는 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer가 adaptor 서열에 oligo(dT)부분이 추가되어 있으므로 adaptor 서열로 된 primer보다 Tm이 높아 보이지만 실제로는 그렇지 않다. AT염기쌍은 GC염기쌍에 비하여 열 안정성이 낮아 oligonucleotide 전체로는 주형 DNA에 annealing되어 있지만 3' 말단의 oligo(dT)부분의 두 가닥은 불안정하다. 이로 인해 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer를 그대로 사용할 경우 PCR 효율이 떨어질 우려가 있으므로 충분한 Tm값(대개 60℃ 이상)을 갖는 adaptor 서열을 디자인하여 adaptor 서열만으로 이루어진 primer로 PCR 하는 것이 좋다.



구체적인 예를 들어보자. 3'-RACE Kit에 들어있는 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer 서열이 다음과 같은 경우이다.

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT
TTT TTT TTT TTT TTT T-3'

이 경우 PCR은 다음과 같은 adaptor primer를 이용하면 좋다.

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'

또한 아래와 같은 Not I용 adaptor 서열이 붙은 primer의 경우는

5'-AAC TGG AAG AAT TCG CGG CCG
CAG GAA (T)₁₈-3'

다음과 같은 길이의 adaptor primer를 준비하면 3'-RACE는 가능하다.

5'-TGG AAG AAT TCG CGG CCG CAG-3'

② 두 개의 primer로 증폭되는 산물을 확인한다.

1-(1) Negative control을 만든다에 기술한 대로 RACE 산물은 때로 한쪽의 primer만으로 증폭되는 경우가 있으므로 subcloning 전에 한쪽 primer만을 갖는 negative control을 두 종류 만들어, 얻어진 산물이 양쪽 primer(adaptor primer와 GSP1 EH는 GSP2)로 증폭된 것인지 확인한다.

③ PCR 산물의 size에 주의한다.

3'-RACE법은 mRNA 기저서열과 poly(A) 서열을 한번의 PCR로 증폭하는 방법이다. 기저서열은 아미노산을 code하고 있는 translated region에 있는 것이 많지만 mRNA의 종류에 따라 translated region downstream에 긴(때로는 수 kb에 달한다) 3' untranslated region(3' UTR)을 갖는 것이 있다. 따라서 sense primer인 GSP1과 antisense primer인 adaptor primer가 너무 멀리 떨어져 있어 원하는 DNA의 증폭이 일어나지 않는 경우가 있다. 아무 것도 증폭되지 않거나 특이적 DNA가 적게 합성될 때는 subcloning하여 sequencing한 것 모두 원하지 않는 DNA가 될 수 있다. 이와 같은 경우 GSP2 downstream에 GSP3를 디자인하여 두 번째 nested PCR을 하면 background는 많이 감소한다(모든 경우에 다 해당되지는 않는다). 또한 긴 단편을 증폭할 수 있는 Taq(TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™)을 이용하여 RACE하는 것이 좋다.

④ PCR산물이 기저서열을 포함하도록 primer를 디자인한다. 앞서 서술한 대로 GSP2 downstream에 최소 20염기 정도의 기저서열이 있도록 primer를 디자인한다. 증폭된 DNA단편을 sequencing할 때 GSP2 서열 다음에 기저서열이 있으면 그 단편은 틀림없이 목적 DNA이다. 만약 GSP2서열 뒤에 전혀 다른 서열이 계속되는 경우는 GSP2가 잘못 annealing되어 증폭된 비특이적 산물을 cloning한 것이다.

⑤ 보통 RT-PCR과 시약을 공유한다

3'-RACE에서 필요한 시약은 대부분 보통 RT-PCR에 사용하는 시약을 그대로 사용할 수 있다. 다른 것은 adaptor 서열을 부가한 oligo(dT) primer와 adaptor 서열로 된 adaptor primer이다. 만약 보유하고 있는 1st strand cDNA합성 kit이 cloning을 위한 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer라면 adaptor 서열로 된 adaptor primer만 합성하면 바로 3'-RACE 실험에 응용할 수 있다.

3. Degenerate PCR법

(1) Degenerate PCR법의 원리

"Degeneracy"는 한 종류의 아미노산이 복수의 codon에 대응하는 현상을 말한다. Degeneracy로 인하여 어떤 특이한 아미노산 서열을 code하는 유전자의 염기서열은 결정할 수 없지만 가능성이 있는 염기서열 모두를 포함하는 oligonucleotide를 합성할 수 있다.

예를 들어 proline-cystein-arginine(Pro-Cys-Arg)의 tripeptide를 생각해 보자. 이 아미노산 서열에 대응하는 codon은 아래 표와 같이 proline이 4종류, cystein이 2종류, arginine이 6종류로 $4 \times 2 \times 6 = 48$ 종류이다.

실제로 48종류의 codon의 조합으로 degenerate oligonucleotide를 합성할 때는 복수의 nucleotide에 대응하는 위치에서는 해당 amidite를 혼합하여 합성한다. 따라서 degenerate oligonucleotide의 조합의 종류는 codon의 조합보다 많아

질 수도 있지만(64종류) 이 oligonucleotide 혼합물 중 한 종류는 tripeptide를 code하는 유전자와 완전히 일치한다. 만일 조합의 수가 그다지 많지 않고 적당한 길이의 degenerate oligonucleotide를 디자인할 수 있다면 이 oligonucleotide는 비교적 특이성 높은 primer로서 작용할 것이다. 이 같은 degenerate oligonucleotide를 primer로 사용하여 PCR을 하면 아미노산 서열정보를 바탕으로 그 단백질의 유전자의 DNA단편이 얻어질 가능성이 있다. 이와 같은 목적으로 디자인된 primer를 degenerate primer, PCR을 degenerate PCR이라고 한다. 이 방법은 기지의 아미노산 서열로부터 그 유전자를 cloning하는 기술이지만 현재는 풍부하게 축적된 핵산의 일차구조(염기서열) 정보를 기초로 유전자군을 검색할 때 널리 이용된다.

구체적인 예로 아래와 같이 두 개의 아미노산 서열이 있다. 이 두 개의 단백질은 진화적으로 보존된 2개의 상동영역을 가지고 있고 상동성 조사시 아미노산이 공통인 부분을 asterisk(*)로 표시하였다(*표는 기능적으로 유사한 아미노산을 나타낸다). 이 공통영역중 upstream 서열(PCRWITH)부터 sense degenerate primer를 디자인하고 downstream 서열(NAFRAGMENT)에서 antisense degenerate primer를 디자인하였으며 primer 부위는 그림 4와 같다.

두 개의 degenerate primer로 PCR을 실시하여 잘 될 경우 그림5와 같은 상동영역을 갖는 새로운 제 3의 단백질 유전자를 얻을 수 있다.

| 아미노산 | Pro | Cys | Arg | |
|------------|-----|-----|-----|--|
| codon | CCA | TGC | AGA | |
| | CCC | TGT | AGG | |
| | CCG | | CGA | |
| | CCT | | CGC | |
| | | | CGG | |
| | | | CGT | |
| 종류 | 4 | 2 | 6 | → $4 \times 2 \times 6 = 48$ 종류 |
| nucleotide | CCN | TGY | MGN | |
| 종류 | 4 | 2 | 2 4 | → $4 \times 2 \times 2 \times 4 = 64$ 종류 |

Nucleotides 혼합염기는 IUPAC에 따라 표기하였다.

단백질 1 : PCRWITHTAQANDPRIMERSAMPLIFIEDASPECIFIC-DNAFRAGMENT

***** *****

단백질 2 : PCRWITHR-EVERSETRANSC-RIPTASEDETECTEDANRNAFRAGMENT

| | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| 아미노산 1문자 표기 | P | C | R | W | I | T | H | | | | |
| 아미노산 3문자 표기 | Pro | Cys | Arg | Trp | Ile | Thr | His | | | | |
| sense strand | CCN | TGY | MGN | TGG | ATH | ACN | CAY | | | | |
| | 4 | 2 | 2 | 4 | | 3 | 4 | 2 | | | |
| sense primer 부위 | → | | | | | | | | | | |
| sense primer | 5' - | CCN | TGY | MGN | TGG | ATH | ACN | CA | -3' | | |
| 아미노산 1문자 표기 | N | A | F | R | A | G | M | E | N | T | |
| 아미노산 3문자 표기 | Asn | Ala | Phe | Arg | Ala | Gly | Met | Glu | Asn | Thr | |
| sense strand | AAY | GCN | TTY | MGN | GCN | GGN | ATG | GAR | AAY | ACN | |
| antisense strand | TTR | CGN | AAR | KCN | CGN | CCN | TAC | CTY | TTR | TGN | |
| 조합 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | | 2 | 2 | 4 |
| antisense primer 부위 | ← | | | | | | | | | | |
| antisense primer | | | | | 3' - | CGN | CCN | TAC | CTY | TTR | TG -5' |

그림 4

단백질 1 : PCRWITH-TAQANDPRIMERSAMPLIFIEDASPECIFICCDNAFRAGMENT
 단백질 2 : PCRWITHREVERSETRANSCRIPTASEDETECTEDANR--NAFRAGMENT
 단백질 3 : PCRWITHDEGE-NE-RATEPRI-MERSGIVESMEANEWCDAFRAGMENT
 consensus : * * * * * * * * * *

그림 5

(2) Degenerate PCR법의 주의점

① Primer의 디자인

Oligonucleotide의 합성은 CPG column에 결합한 3' 말단의 nucleotide에서 시작하므로 degenerate primer의 3' 말단은 한 종류의 nucleotide여야 한다.*1

* 1 아미노산 서열에서 염기서열을 찾으려면 아미노산 codon 대응표를 사용하면 편리하다.

또 degenerate primer서열의 종류는 가능하면 1,000개 정도까지를 기준으로 만드는 것이 좋다. Primer의 종류가 너무 많으면 primer 1종류 당 mol수가 적게 되어 특이성도 저하된다. Primer의 종류가 많을 경우는 inosin을 N(4 종류의 염기)부분에 이용하면 어느 염기에도 강하게 결합하지 않고 두 가닥 DNA 형성을 저해하지도 않으므로 도움이 된다. Inosin을 이용하였을 때의 Tm계산 방법은 3-(2)-③을 참조한다.

② 증폭된 산물의 크기

Degenerate PCR로 얻어진 산물을 그대로 사용하는 경우

는 없으며 대부분 그 산물을 기본으로 cDNA 해석영역 전체를 cloning 하는 방법을 많이 이용한다. 주로 아래 두가지 방법을 많이 사용한다.

i) 얻어진 cDNA 단편을 probe로 cDNA library를 screening한다.

ii) Cloning된 영역의 염기서열 정보를 기본으로 5'-RACE, 3'-RACE한다.

목적하는 밴드의 크기는 아미노산으로 해서 30~300잔기 전후가 가장 좋다. 너무 작을 경우에는 반응에 무리가 있고, 너무 길 경우는 짧은 비특이적 산물과 구별하기 어렵고 degenerate primer로 인한 비특이적 증폭이 많이 일어나므로 100~1,000 bp가 적당하다.

③ Degenerate primer의 Tm

Degenerate primer의 annealing 온도는 primer에 포함되어 있는 서열 중 가장 낮은 Tm을 기준으로 한다. 또 inosin은 DNA의 두 가닥에 적극적으로 수소 결합(Tm을 높게 한다)을 하지 않고 두 가닥 형성을 저해(Tm을 낮게 한다)하지도 않으므로 Tm 계산시 고려하지 않아도 된다.

3-(1) Degenerate PCR 법의 원리에서
sense primer의 경우

5'-CCN T G Y M G N T G G A T H A C N CA-3'

↑ ↑ ↑ ↑

↑의 NYMH 부분을 A나 T라고 계산하면

AT=12, CG=8에서 GC%=40, 20염기가 되고 Tm
추정값은 52℃가 된다(표 1 참조).

만약 N부분에 inosine을 갖고 있는 경우

5'-CC I T G Y M G I T G G A T H A C I CA-3'

↑ ↑ ↑

AT=9, CG=8에서 GC%=47, 17염기가 되고 Tm
추정값은 51℃가 된다(표 1 참조).

④ 비특이적 증폭의 배제

Degenerate PCR에서 가장 중요한 것은 비특이적 증폭을
얼마나 배제하는가 하는 것이다. 비특이적 증폭을 줄이기
위해서는 nested PCR을 하거나 염기 내부에 몇개의
nested primer를 설정하는 것이 효과적이다.

3-(1) Degenerate PCR 법의 원리에서 기술한 구체적인
예를 들어보면 최초 antisense primer를 보존영역 후반부
분에 설정하여 아래와 같이 겹치도록 nested primer를 만
든다. 이 예에서는 nested primer 내부에 Asn codon을

증폭산물의 검정에 이용할 수 있다. 또 hot start법도 비특
이적 증폭을 배제하는데 효과적이다(그림 6참조).

(3) 증폭산물의 판정

Degenerate PCR로 cloning한 단편이 특이적 산물인지 비특
이적 산물인지를 판정하기 위해 다음 사항을 고려해야 한다.

① PCR생성물의 크기가 기지 유전자에서 예상한 것과 일
치하는가?

유전자에 따라 크기가 많이 분산되어 있는 경우도 있지
만 대부분의 경우는 어느 정도 생성물의 크기가 예상된다.

② Sense primer와 antisense primer의 frame이 맞는가?
Degenerate primer는 아미노산 서열을 기본으로 디자
인하므로 sense와 antisense codon frame이 일치해야
한다.

③ Primer의 내부에 보존영역이 설정되었는가?
증폭하는 서열의 내부에 잘 보존된 아미노산이 있을 때
그 아미노산 존재의 유무로 목적산물 여부를 판정할 수
있다.

그러나 이 아미노산이 없을 경우라도 그 clone이 목적
유전자가 아니라고 단정할 수는 없다.

4. AP-PCR법과 DD법

AP-PCR(arbitrarily primed-PCR, 임의 서열 primer-
PCR)은 앞서 설명한 방법과는 달리 비특이적인 PCR을

| GC함량(%) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Nucleotide 길이(bp) | 16 | 30 | 32 | 34 | 36 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 50 |
| | 17 | 31 | 33 | 35 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 48 | 52 |
| | 18 | 33 | 35 | 37 | 39 | 41 | 43 | 45 | 47 | 49 | 54 |
| | 19 | 34 | 37 | 39 | 41 | 43 | 45 | 47 | 49 | 51 | 55 |
| | 20 | 36 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 48 | 50 | 52 | 56 |

표 1 Oligonucleotides의 Tm(℃)

| | | | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 아미노산 1문자 표기 | N | A | F | R | A | G | M | E | N | T |
| 아미노산 3문자 표기 | Asn | Ala | Phe | Arg | Ala | Gly | Met | Clu | Asn | Thr |
| sense | AAY | GCN | TTY | MGN | GCN | GGN | ATG | GAR | AAY | ACN |
| antisense | TTR | CGN | AAR | KCN | CGN | CCN | TAC | CTY | TTR | TGN |
| antisense primer | | | | | | | | | | |
| nested primer | ← | | | | | | | | | |

그림 6

적극적으로 활용하는 방법이다. PCR 반응에서 낮은 온도에서 장시간 annealing하면 primer의 3' 말단의 짧은 homology부터 mismatch priming이 일어난다. 최초 몇 cycle을 mismatch priming이 일어나도록 저온에서 annealing하면 양쪽에 primer를 가지는 DNA단편이 생기므로 그 후 보통 PCR로 mismatch priming을 일으킨 DNA단편이 증폭된다. 이와 같은 방법으로 염기서열 정보가 없는 genome에서 다양한 길이의 DNA 단편을 얻을 수 있으며 고분해능의 변성 polyacrylamid gel로 분리한다. 만일 genome에 결실이 있으면 그 영역에서 유래하는 단편은 전기영동 밴드상에 결실로 확인되며 genome 일부에 중복이 있으면 특정 밴드가 두께가 보인다.

Complexity 높은 genome DNA를 비교하여 genome 내에 적당한 copy수로 흩어진 반복서열을 probe로 사용하여 southern hybridization하는 DNA fingerprinting법을 사용하지만 AP-PCR은 arbitrary primer의 priming부위를 "probe"로 한 DNA fingerprinting 방법을 사용한다. 단지 southern hybridization을 사용한 fingerprinting과 달리 밴드로 나타나는 DNA는 모두 말단에 primer 서열을 가지는 PCR 산물이므로 밴드를 바로 gel에서 회수하여 PCR로 증폭하고 해석할수 있는 점이 크게 다르다.

이 AP-PCR의 원리를 RT-PCR에 적용한 것이 DD법(differential display법)이며 기본적으로 AP-PCR과 다른 점은 없다. DD법은 아주 간단하고 흥미로운 유전자가 곧 얻어질 수 있을것 같아 많이 이용되고 있지만 false positive clone이 많이 나오는 등 어려운 점이 많다.

False positive 밴드가 생기는 이유는 무엇일까? DD법은 최종적으로 얻어진 밴드(PCR 생성물량)가 각각의 초기주형량을 반영하고 있다는 전제로 시작되는 실험 방법이다. DD법으로 실험한 후 전기영동에서 점차적으로 증가하는 많은 단편은 primer서열을 공통으로 가진다는 것 이외에

는 길이, GC함량도 각각이다. 초기 주형량(mol수)이 다른 많은 산물이 섞여 있어 이 많은 단편을 동시에 증폭하기 위해서는 상당히 복잡한 competitive PCR을 해야 한다.

최종 생성물량이 초기 주형량을 반영한다는 DD법의 전제가 성립되기 위해서는 각 산물이 동시에 plateau 상태에 도달하여 증폭을 정지해야 하는 competitive PCR의 조건을 만족해야만 한다. 그러나 DD법으로 실험하는 여러 종류의 단편에서 모든 산물이 동시에 증폭되는 일은 거의 없으므로 false positive 밴드가 나오게 된다. 발현에 차이가 있는데도 불구하고 DD법에서는 검출되지 않는 false negative 밴드가 나올 수도 있지만 이런 경우 특별한 screening법이 없어 모르고 지나칠 수도 있다.

이와 같이 PCR의 kinetics를 고려하면 DD법으로 false positive clone이 많이 나올 수 있으므로 screening 과정을 통하여 positive clone이 고효율로 얻어지도록 해야 한다. 한번의 실험으로 유용한 clone이 얻어질 것이라는 생각으로 실험하는 것은 상당히 위험하므로 주의하여야 한다.

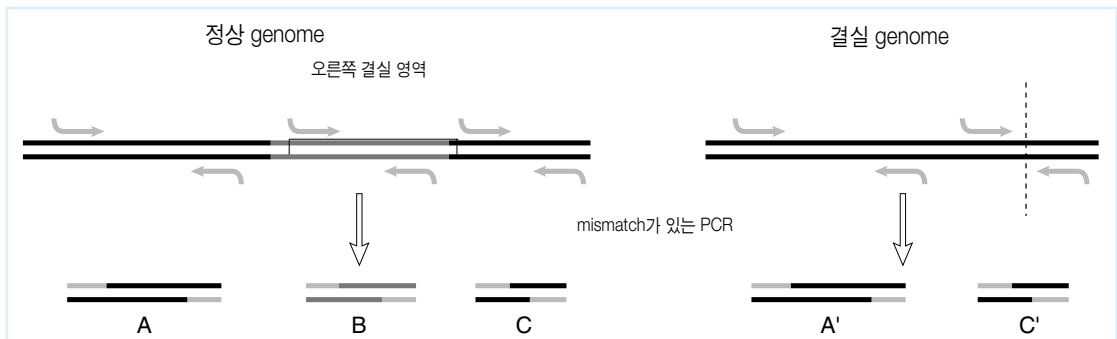
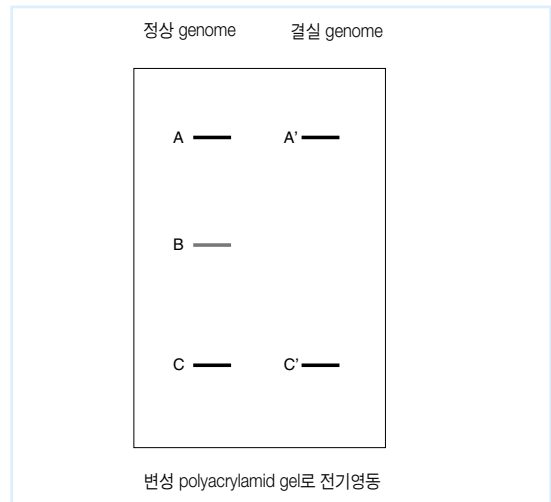


그림 7

PCR을 이용한 미지 영역의 Cloning (2)

PCR은 기지서열의 일부를 primer로 제작하여 primer의 특이성으로 primer 사이의 영역을 증폭하는 방법이다. PCR은 기지유전자의 cloning에 널리 이용하고 있으며 미지유전자의 cloning을 위한 여러 가지 방법이 고안되어 실용화되고 있다. 대표적인 미지 유전자의 cloning 방법으로 1)3' -RACE법, 2)Degenerate PCR법, 3)AP-PCR법과 DD법, 4)5' -RACE법 등이 있다. 본 고에서는 5' -RACE법을 중심으로한 미지 영역 cloning법에 대해 소개한다.

1. 5' -RACE법

(1) 5' -RACE법의 원리

① TdT를 사용한 5' -RACE법

5' -RACE는 mRNA의 서열의 일부를 알고 있을 때 5' upstream의 미지영역을 cloning하기 위한 방법이다. 그림 1에 5' -RACE법의 원리를 나타내었다. 우선 upstream의 미지영역을 찾기 위해서 기지 서열을 토대로 한 특수 유전자인 anti-sense primer(GSP1)를 이용하여 역전사 반응을 한다. 그 후 cDNA와 두가닥을 이루고 있는 mRNA를 RNase H로 분해하여 한 가닥의 1st strand cDNA를 만든다. 이 DNA는 5' 말단에 GSP1의 서열을 가지고 3' 말단에는 미지서열을 갖고 있다. 이 미지서열을 PCR로 증폭하기 위해서 1st strand cDNA의 3' 말단에 anchor

서열을 부가해야 한다. 보통 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase(TdT)로 nucleotide homopolymer를 anchor서열로 부가한다. Anchor서열을 부가한 후 anchor서열 3' 말단에 상보적인 nucleotide polymer를 갖는 adaptor primer인 anti-sense primer(GSP2*)를 사용하여 nested PCR로 5' downstream의 미지영역을 포함하는 cDNA를 증폭한다.

*1 이때 유전자 특이적 primer인 GSP1을 사용하면 anti-sense primer를 사용하는 경우보다 비특이적 증폭이 일어나기 쉽기 때문에 GSP2를 보다 upstream쪽에 design하고 nested PCR하는 것이 좋다.

② RNA ligase를 사용한 5' -RACE법

한가닥 핵산을 ligation 시키는 RNA ligase로 한가닥 oligonucleotide adaptor를 ligation하여 1st strand

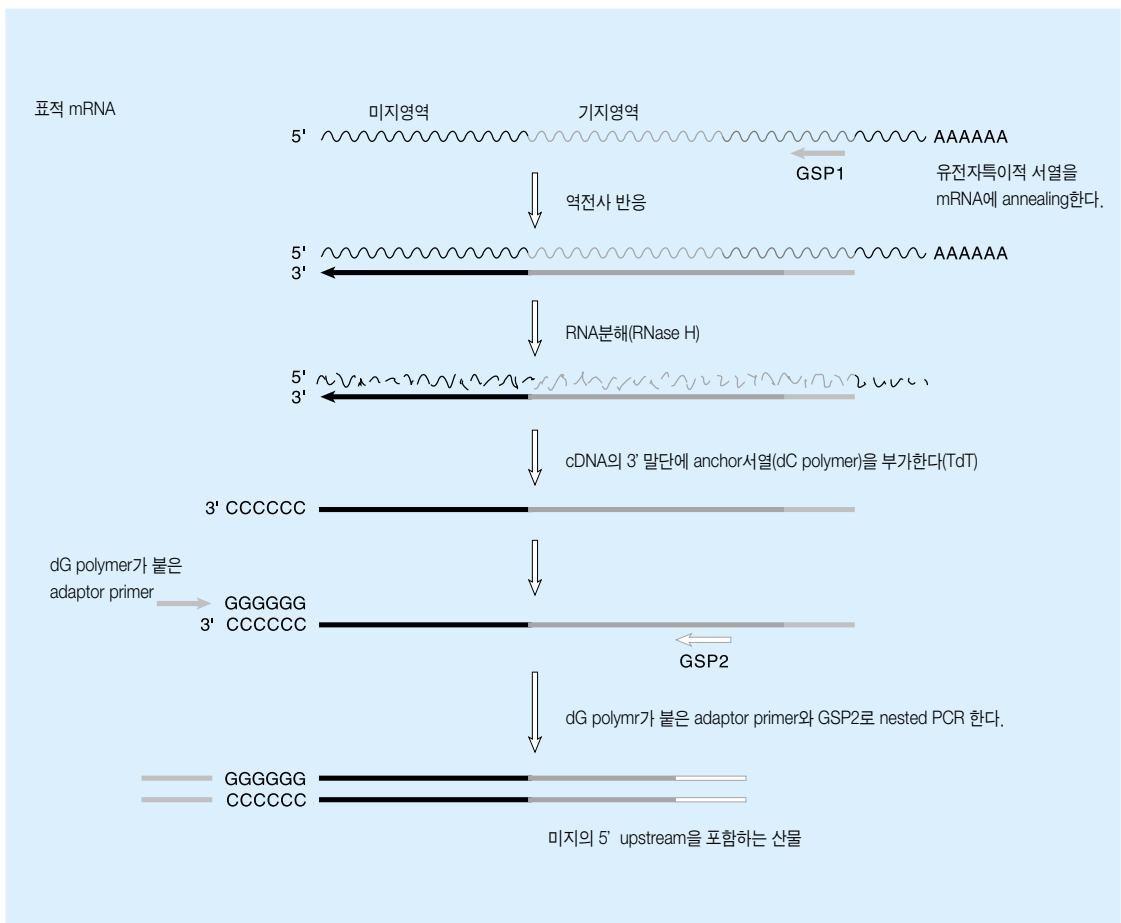


그림 1 5' -RACE법에 의한 미지 영역의 cloning

cDNA를 정제하는 방법이다.

「1-(1)-①의 TdT를 이용한 5'-RACE법」에서의 한가닥 1st strand cDNA를 정제하는 것은 유사하나 1st strand cDNA의 3' 말단에 anchor 서열로 nucleotide homopolymer를 부가하는 점이 다르다. 이때 사용하는 oligo nucleotide adaptor는 1st strand cDNA와 ligation 할 수 있도록 5' 말단이 인산화 되어 있다. 그러나 adaptor끼리 결합한 concatemer 형성을 막기 위하여 3' 말단 OH를 제거하거나(dideoxy화) amino기로 바꾸는 (amino화) 수식을 해야한다.*1

*1 5' 말단의 인산화와 3' 말단의 amino화는 oligonucleotide 합성시에 할 수 있다. TaKaRa 홈페이지(www.takara.co.kr) 합성 DNA 수식란 참조

이 방법은 1-(1)-①의 TdT로 homopolymer anchor 서열

을 부가하는 방법과 비교하면 여러 가지 잇점이 있다.

- i) Homopolymer를 이용하는 경우는 anchor 서열의 poly(G)부분이 cDNA의 C가 풍부한 부분과 비특이적인 annealing이 일어나기 쉬워 양 말단에 anchor 서열을 가지는 비특이적 증폭이 일어나기 쉽지만 oligonucleotide adaptor를 ligation하여 보다 특이성이 높은 adaptor primer를 design 할 수 있다.
- ii) Ligation하는 oligonucleotide adaptor를 어느 정도 길게 디자인하면 adaptor측에도 nested primer를 설정할 수 있다(Column: RNA ligase를 사용한 5'-RACE법 참조).

RNA ligase를 이용하여 5'-RACE 할 경우, RNA ligase는 한가닥 DNA의 ligation보다 효율이 높지 않고 조건도 까다롭다.

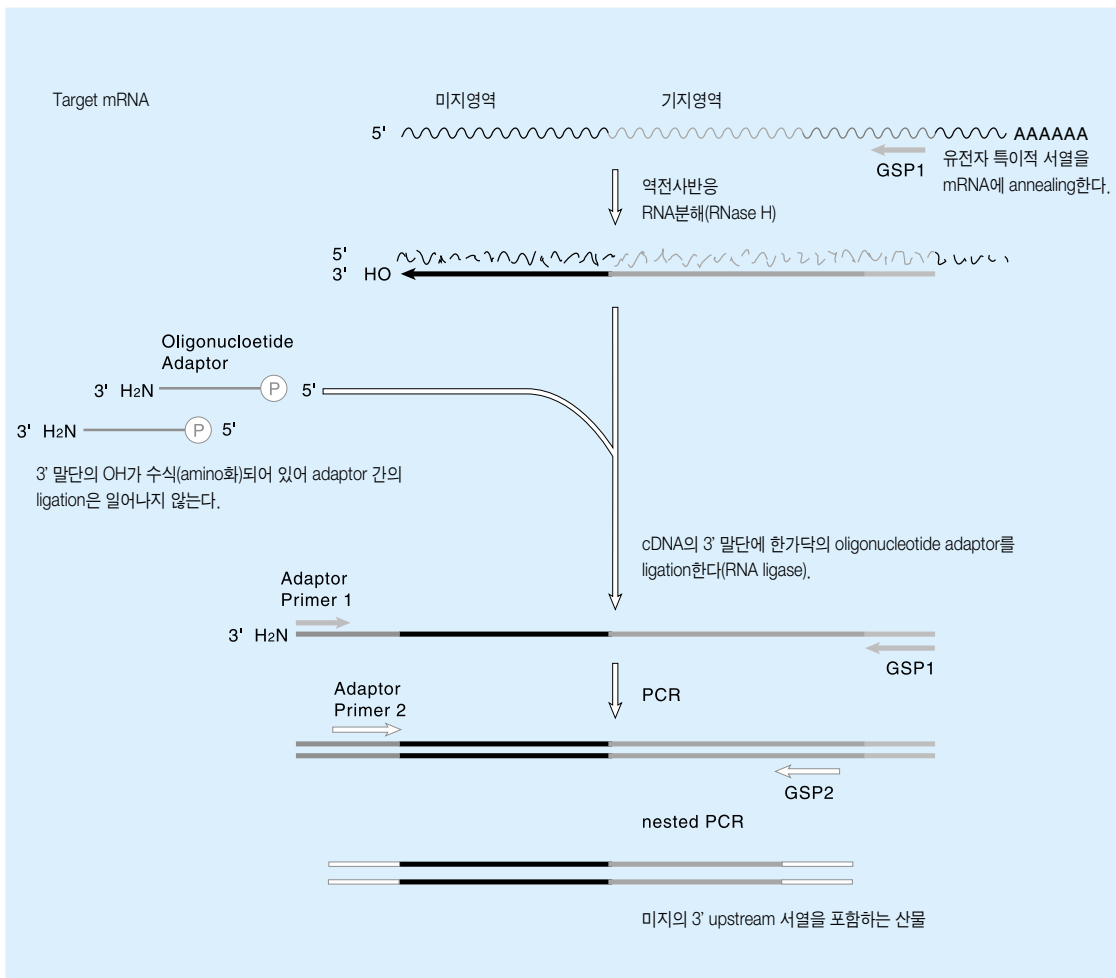


그림 2 RNA ligase를 사용한 5'-RACE법

◆ [Column] RNA ligase를 이용한 5'-RACE법

"Trends in Genetics"에 RNA ligase를 이용한 5'-RACE이 소개되어 있다. RNA ligase를 이용한 5'-RACE법에서는 1st strand cDNA의 말단에 A와 같이 adaptor oligonucleotide를 RNA ligase로 ligation한다. 이 adaptor 서열은 B와 C, 두가지 primer를 합성하여 처음에 B와 GSP1으로 PCR을 하고, 다음에 GSP2와 C로 nested PCR을 한다. 이 방법으로 기존의 방법에 비해 특이적 산물의 증폭량이 증가한다고 보고되어 있다.

A: 3'-N₁N-CCGTTACAGCTGGAGGGATGTTGGGCTTAAGGATGp-5'

B: 5'- GGCAATGTCGACCTCCTACAAC-3'

C: 5'- CTCCTACAACCCGAATTCCTAC-3'

* Zhi Chen : Simple modifications to increase specificity of the 5'-RACE procedure, *Trends in Genetics* 12 : 87-88, 1996

③ 실제 5'-RACE법을 할 경우

3'-RACE는 보통 RT-PCR과 거의 유사하나 5'-RACE는 단계가 많고 복잡하다. 1st strand cDNA의 3' 말단에 anchor 서열을 부가하는 단계에서 1st strand cDNA 합성시에 사용한 primer(GSP1)가 남아 있으면 primer에

anchor서열을 부가하는 반응이 계속 일어나 이후 증폭단계에서도 다른 증폭은 일어나지 않는다. 따라서 1st strand cDNA 합성 후 반드시 고분자량의 cDNA를 정제하여 primer를 제거해야 한다.

또한 TdT와 RNA ligase를 사용하는 경우는 까다로운 조건설정을 해야한다. 미량의 cDNA를 정제하거나 TdT 방법 등을 이용하여 자신의 실험조건에 맞추고, 필요한 시약을 각각 구매하여 실험에 이용할 수 있지만 kit를 이용하는 것이 초심자에게는 안정적인 실험 결과를 얻을 수 있다. 본고에서는 TaKaRa사의 5'-Full RACE CORE Set(TaKaRa Code 6122)를 사용한 5'-RACE법에 대하여 소개한다.

(2) 5'-RACE법의 주의점

① 양쪽 primer로 증폭된 것을 확인한다.

"PCR을 이용한 미지영역의 cloning I"의 일반적인 주의사항에서 기술한 바와 같이 RACE의 산물이 가끔 한쪽 primer로만 증폭되는 경우가 있다. 특히 5'-RACE에서 사용하는 anchor 서열을 부가한 adaptor primer는 C잔기가 많은 서열로 비특이적인 annealing이 일어나기 쉬워

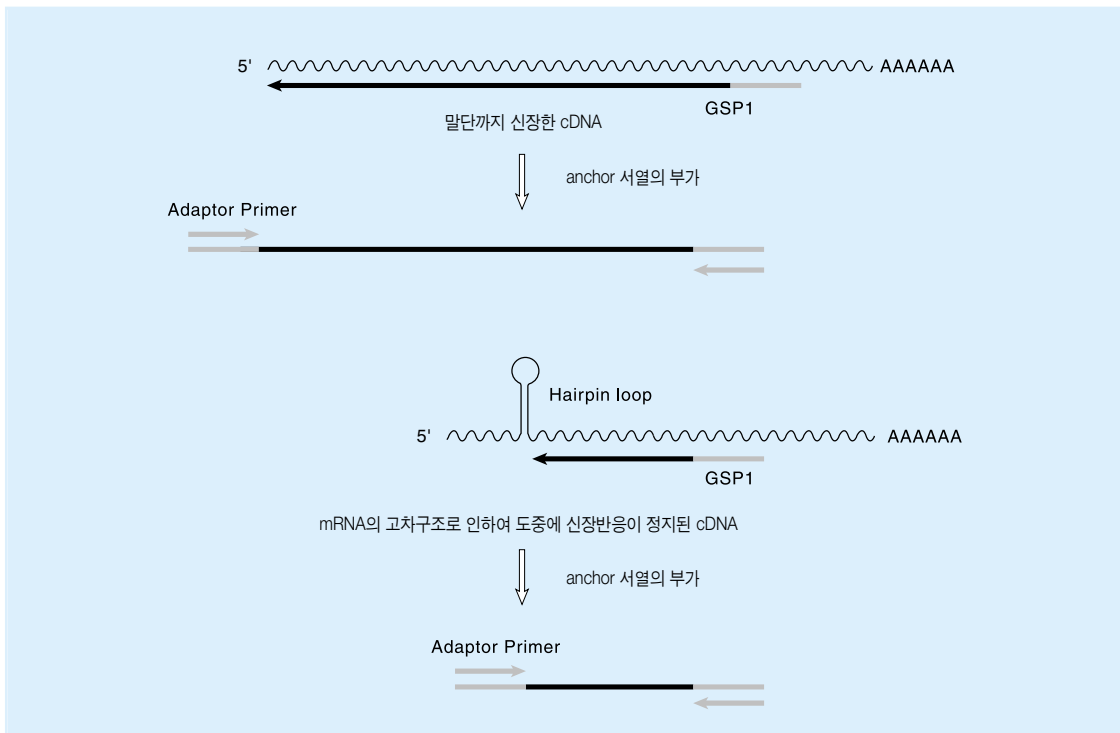


그림 3 5'-RACE법에 의해 증폭한 단편

양쪽에 adaptor primer를 가진 비특이적 증폭 산물이 되기 쉽다. 그러므로 subcloning하기 전에 한쪽 primer만을 가진 negative control을 2종류 준비하여, 증폭된 밴드가 양쪽 primer(adaptor-adaptor, GSP1-GSP2)에 의해 증폭된 것을 확인하는 것이 좋다.

② PCR 산물의 크기에 주의한다.

5'-RACE는 mRNA의 기저서열에서 upstream 미지영역의 1st strand cDNA를 PCR로 증폭하는 방법이다. 역전사효소로 1st strand cDNA 신장반응은 mRNA의 hairpin loop나 고차구조로 인하여 가끔 증폭 도중에 반응이 끝나 adaptor primer와 GSP2로 증폭된 DNA는 다양한 단편의 혼합물이 된다(그림 3 참조). PCR 반응에서는 짧은 단편이 먼저 증폭되기 쉬운 경향이 있어 짧은 cDNA 단편이 증폭될 경우 완전한 길이의 단편이 증폭되지 못한 채 반응이 끝나버린다.

이와 같은 문제점은 일단 5'-RACE를 한 후 "PCR을 이용한 미지영역의 cloning I"의 일반적인 주의 사항 중 "1-(2) Size를 분획한다"에서 기술한 바와 같이 전기영동한 다음 agarose에서 고분자 DNA를 회수하여 다시 한번 PCR 한다.

또 한가지 방법은 일단 5'-RACE에서 upstream 영역을 cloning하는 것이다. 즉 upstream 영역의 염기서열을 조

사한 후, 그 데이터를 기초로 새로운 primer를 합성하여 다시 한번 5'-RACE를 한다. 기저서열이 mRNA의 downstream에 있고 upstream에 이상한 길이의 기저서열이 존재하는 경우, 한 번의 5'-RACE로 완전한 길이의 cDNA를 얻는 것이 불가능하므로 후자의 방법이 더 현실적이다(그림 4 참조).

③ PCR산물이 기저서열을 함유하는 primer를 디자인한다. "PCR을 이용한 미지영역의 cloning I"을 참조한다.

④ Anchor primer에 대하여

A사의 anchor primer(anchor 서열을 부가한 adaptor primer)를 그림 5에 나타내었다. Anchor 부분은 dG homopolymer가 아닌 그 중간에 inosine을 함유하고 있으며 이는 anchor 부분의 Tm이 너무 높아지지 않도록 하기 위한 것이다. 일단 5'-RACE를 한 후 PCR산물을 전기영동하여 agarose gel에서 추출한 뒤 다시 한번 PCR한 경우는 anchor 서열을 포함하지 않는 adaptor 서열의 adaptor primer(A사 kit에서는 UAP로 명명)를 사용한다. Adaptor primer는 몇 번의 PCR로 부족한 경우가 있으므로 별도로 합성해 두는 것이 좋다. 이런 경우 kit의 UAP는 UDP cloning을 위하여 서열이 부가되어 있지만 T-vector를 사용하는 것이 불필요하므로 그림 5의 맨 아래 부분에 있는 20잔기를 합성하는 것이 좋다.

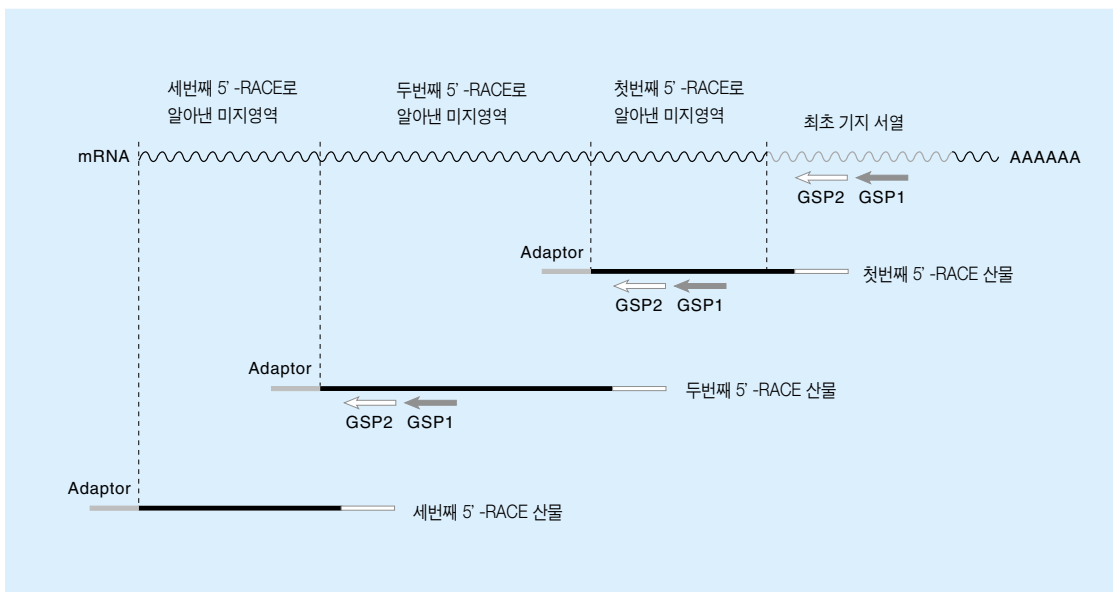


그림 4 반복 5'-RACE에 의한 완전 길이의 5'-말단 mRNA의 cloning

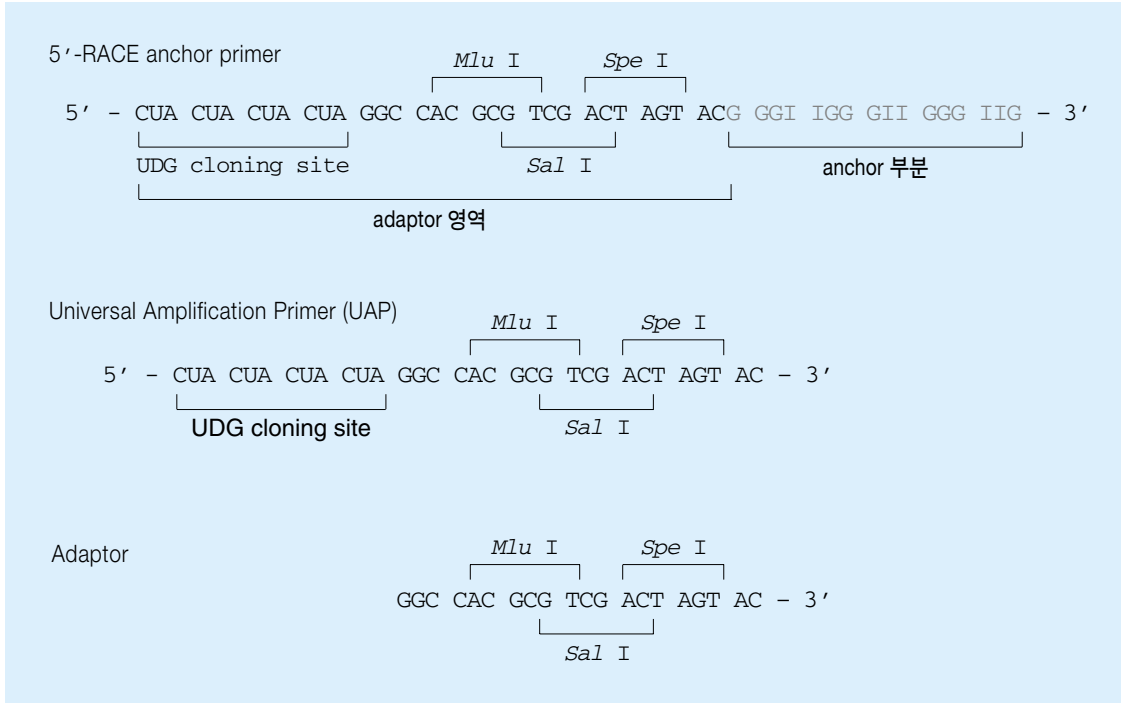


그림 5 5'-RACE의 primer와 adaptor 서열

(3) 5'-RACE 법의 실험 예

본 고에서는 TaKaRa사의 5'-Full RACE CORE Set(TaKaRa Code 6122)를 이용한 5'-RACE법에 대하여 소개한다.

■ Set의 내용

| | |
|--|-------------|
| AMV Reverse Transcriptase XL(5 U/ μ l) | 10 μ l |
| RNase Inhibitor(40 U/ μ l) | 10 μ l |
| 10 \times RT Buffer | 15 μ l |
| RNase Free dH ₂ O | 1 ml |
| RNase H(60 U/ μ l) | 10 μ l |
| 5 \times Hybrid RNA Degeneration Buffer | 150 μ l |
| T4 RNA Ligase(40 U/ μ l) | 10 μ l |
| 5 \times RNA(ssDNA) Ligation Buffer | 80 μ l |
| 40% PEG #6000 | 200 μ l |
| Positive Control RT-Primer(200 pmol/ μ l) | 10 μ l |
| Positive Control 1st Primer Pair(20 pmol/ μ l) | 10 μ l |
| Positive Control 2nd Primer Pair(20 pmol/ μ l) | 10 μ l |
| Positive Control RNA(10 ng/ μ l) | 10 μ l |

■ 5' RACE법에 필요한 시약

- TaKaRa Taq™(TaKaRa Code R001) 또는 TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code RR001) 또는 TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2(TaKaRa Code RR013)
- 5' 말단 인산화 RT-primer(역전사 반응시 사용)
- 1st PCR용 primer 2종(1st PCR에 사용)
- 2nd PCR용 primer 2종(2nd PCR에 사용)

① 1st Strand cDNA의 합성

■ 반응액조성

| | |
|--|------------------|
| poly(A) ⁺ RNA or Total RNA | 0.5~5 μ g |
| 10 \times RT Buffer | 1.5 μ l |
| RNase Inhibitor(40 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| AMV Reverse Transcriptase XL(5 U/ μ l) | 1 μ l |
| 5' 말단 인산화 RT primer*(1 μ g/ μ l) | 1 μ l |
| RNase free dH ₂ O | up to 15 μ l |

* : RT-primer는 ligation에 필요하기 때문에 5' 인산화한 것을 사용한다. 합성시에 인산화하여 두면 좋다. 또한 12~15 mer의 길이가 적합하다.

■ 실험순서

- i) 위의 반응액을 조제한다.
 ii) TaKaRa Thermal Cycler GP or Dice에 세팅하여 아래의 조건으로 반응한다.

| | |
|-----|-----------|
| 30℃ | 10 min |
| 50℃ | 30~60 min |
| 80℃ | 2 min |
| 4℃ | |

② Hybrid RNA의 분해

■ 반응액조성

| | |
|-----------------------------------|------------|
| 1st Strand cDNA 용액 | 15 μ l |
| 5× Hybrid RNA Degeneration Buffer | 15 μ l |
| dH ₂ O | 45 μ l |
| Total | 75 μ l |

■ 실험순서

- i) 위의 반응액을 조제한다.
 ii) RNase H를 1 μ l 첨가하여 30℃에서 1시간 반응한다.
 iii) 반응종료 후 에탄올로 침전한다.

③ Ligation 반응에 의한 한가닥 cDNA의 환상(concatemer)화

■ 반응액조성

| | |
|-------------------------------|------------------|
| 5× RNA(ssDNA) Ligation Buffer | 8 μ l |
| 40% PEG #6000 | 20 μ l |
| dH ₂ O | up to 40 μ l |

■ 실험순서

- i) 위의 반응액을 조제한다.
 ii) Ethanol 침전으로 회수한 ss cDNA의 침전에 위의 반응액을 첨가하여 잘 혼합한다.
 iii) T4 RNA Ligase를 1 μ l 첨가하고 16℃에서 하룻밤(15~18시간) 반응한다.
 iv) 반응을 시작할 때까지 -20℃에서 보존.

④ PCR에 의한 증폭반응

PCR반응은 TaKaRa Taq™(TaKaRa Code R001),

TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code RR001), TaKaRa PCR Amplification Kit(TaKaRa Code R011), TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1(TaKaRa Code RR013), Premix Taq™(TaKaRa Taq Version) (TaKaRa Code No. R004A), Premix Taq™(Ex Taq Version) (TaKaRa Code RR003), One Shot LA PCR Mix(TaKaRa Code RR004) 중 어느 것을 사용할 수 있다. 통상적으로 TaKaRa Taq™을 이용한 반응으로 만족한 결과를 얻을 수 있으나 목표로 하는 단편이 긴 경우와 높은 증폭 효율을 원할 때는 TaKaRa Ex Taq™이나 TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1을 사용하는 것이 보다 양호한 결과를 얻을 수 있다.

〈TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1를 사용한 반응예〉

Ligation 반응이 끝난 시료를 TE buffer로 10배 희석하여 template로 사용하여 반응한다.

① 1st PCR 반응

■ 반응액조성

| | |
|---|------------------|
| Template DNA | 1 μ l |
| 10× LA PCR Buffer II(Mg ²⁺ plus) | 5 μ l |
| dNTP Mixture(각 2.5 mM) | 8 μ l |
| 1st PCR용 Primer S1(20 pmol/ μ l) | 0.5 μ l |
| 1st PCR용 Primer A1(20 pmol/ μ l) | 0.5 μ l |
| TaKaRa LA Taq™(5 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| dH ₂ O | up to 50 μ l |

■ 실험순서

- i) 위의 반응액을 조제한다.
 ii) TaKaRa PCR Thermal Cycler GP or Dice에 세팅하여 아래의 조건으로 반응한다.

| | | |
|---------|-----------|-------------|
| 94℃, | 3 min | |
| | ↓ | |
| 94℃, | 30 sec | } 25 Cycles |
| 50~65℃, | 30 sec | |
| 68~72℃ | 0.5~5 min | |

② 2nd PCR 반응

■ 반응액조성

| | |
|---|------------------|
| 1st PCR Solution* | 1 μ l |
| 10× LA PCR Buffer II(Mg ²⁺ plus) | 5 μ l |
| dNTP Mixture(각 2.5 mM) | 8 μ l |
| 2nd PCR용 Primer S2(20 pmol/ μ l) | 0.5 μ l |
| 2nd PCR용 Primer A2(20 pmol/ μ l) | 0.5 μ l |
| TaKaRa LA Taq(5 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| dH ₂ O | up to 50 μ l |

*1 : 선명한 PCR 증폭산물을 얻기 위해서는 반응 원액, 10배, 100배 희석하여 각각 1 μ l을 2nd PCR용액에 첨가하여 3가지 PCR을 시행하면 좋다.

■ 실험순서

- i) 위의반응액을 조제한다.
 ii) TaKaRa PCR Thermal Cycler GP or Dice에 세팅하고 아래의 조건으로 반응한다.

| | | |
|--------|-----------|----------------|
| 94℃ | 30 sec | } 25~30 Cycles |
| 50~65℃ | 30 sec | |
| 68~72℃ | 0.5~5 min | |

- iii) 반응종료 후 반응액의 일부를 전기영동하여 해석한다.

PCR-SSCP법에 의한 암 유전자 해석

- I. AP-PCR-SSCP법에 의한 암 DNA 해석
- II. 비방사성 표식 PCR-SSCP에 의한 암 DNA의 임상검사

I. AP-PCR-SSCP법에 의한 암 DNA 해석

발암 기작을 연구하는 한 방법으로서 흔히 암 세포 genome상에 존재하는 DNA의 결실 유무를 검사하며, 현재까지 많은 암 관련 유전자 특히 암 억제 유전자의 동정에 매우 중요한 역할을 하였다. 대표적인 암 억제유전자로 *p53* 유전자와 *RB* 유전자가 있으나 암세포의 이상 출현빈도는 종양의 종류 및 암 진행도에 따라 큰 차이가 있으며, 여러 종류의 세포에서 발암 기작을 공통적으로 설명하기에는 부족하다.

Human 간암세포(hepatocellular carcinoma: HCC)의 예를 들면 진행중인 암은 일정 빈도의 loss of heterozygosity(LOH) 및 유전자 내의 염기치환 등 DNA 이상^{1~4)}이 확인되지만, 조기암인 경우 일부 LOH의 보고를 제외하고 이상은 검출되지 않는다¹⁾. 이 기지 유전자좌에서 암부의 특이적 이상의 검출은 기존의 많은 검사법으로 쉽게 검출하고 있으나 기지유전자의 해석에서 얻을 수 있는 정보는 극히 제한적이다. 이러한 견지에서 암세포 genome 미지영역에서 DNA 이상의 광범위한 검색은 매우 중요하다.

Welsh 팀에서 개발한 arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR)⁶⁾법은 검색 대상 DNA 영역의 염기서열 정보없이 human cancer DNA 해석에 이용할 수 있다. 즉 DNA mismatch 수복 기작의 이상(replication error: RER)으로 미지영역의 단순 반복서열수의 변화 검출⁷⁾, genome상의 염기서열 결실이나 증폭 등 이상의 검출^{8, 9)}에 이용된다.

본 고에서는 AP-PCR로 생성된 DNA 단편의 single-strand conformation polymorphism(SSCP)을 해석^{10, 11)}하는 AP-PCR-SSCP법에 의한 DNA 이상 검사에 대하여 소개한다.

1. AP-PCR 원리

그림 1에 AP-PCR의 원리를 나타내었다. 한개의 primer를 이용하여 낮은 온도·장시간의 annealing 조건에서 PCR하면 primer와 주형 DNA의 염기서열간에 다소 mismatch가 존재하여도 annealing이 형성되어 DNA 합성이 시작된다. 이 조건에서 1~수 cycle의 PCR(low stringency PCR)을 한다. 이렇게 생성된 DNA단편을 주형으로 같은 primer를 사용하여 높은 온도·단시간 annealing 조건에서 30~40 cycle PCR(high stringency

PCR)한다. 이 결과 같은 primer 염기서열로 증폭된 수 십개의 DNA 단편을 genome상의 다양한 위치에서 증폭할 수 있다.

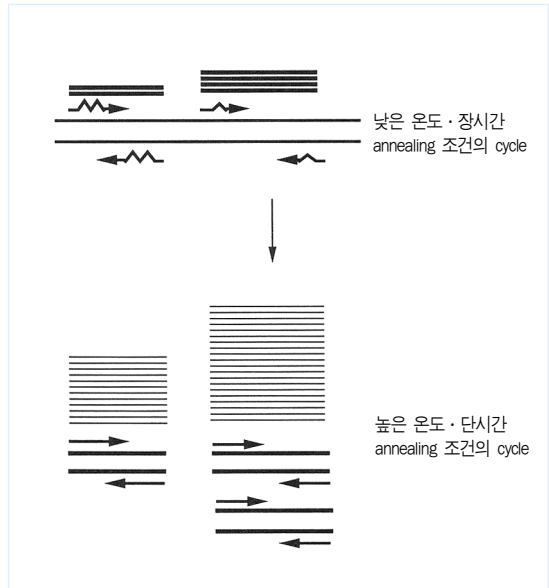


그림 1 AP-PCR 원리

Arbitrarily primer를 사용하여 low stringency annealing 조건에서 genome DNA에 hybridization 하면 mismatch를 포함한 hybrid가 형성된다. 이 조건으로 PCR을 여러번 하면 mismatch primer 상태로 DNA 합성을 한다. 합성 후 보통의 annealing 조건으로 PCR하면 이미 합성된 DNA를 주형으로 완전하게 match된 primer로 PCR 산물을 얻을 수 있다. 이런 조건에서 합성한 주형 DNA 단편은 재현성이 높으므로 최종적으로 얻은 DNA 단편도 높은 재현성을 나타낸다.

2. AP-PCR

Human 암 조직 및 정상조직에서 DNA를 proteinase K-phenol chloroform법¹²⁾으로 추출하여 주형으로 사용한다.

| | |
|--|---------------|
| 주형 DNA | 50 ng |
| [γ - ³² P] ATP 표식 primer(18~27 nucleotides) | 2 μ M |
| 4 dNTP | 각 125 μ M |
| Taq DNA polymerase | 0.5 unit |
| PCR buffer | |
| (최종농도: Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl ₂ 5 mM) | |
| [α - ³² P] dCTP | 1 μ Ci |

[γ -³²P]ATP표식 primer에 첨가하여 [α -³²P]dCTP로 DNA 단편 내부를 표식하여 길이가 긴 DNA 단편을 쉽게 검출할 수 있다.

PCR은 3분간 denaturation 후 low stringency annealing 조건에서 PCR(94℃ 1분, 50℃ 1분, 72℃ 2분) 5 cycle, high stringency annealing 조건에서 PCR(94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분)반응 30 cycles 실시 후 8분간 final extension 한다.

3. 전기영동

PCR 반응액과 동량의 formamide loading dye(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)를 첨가하고 90℃ 3분간 denaturation 후 각 2 μ l를 두 종류의 전기영동법으로 해석한다.

DNA 단편을 서열길이에 따라 분리하는 AP-PCR법으로 해석하는 경우 전기영동 조건은 8 M 요소를 함유하는 5% polyacrylamide 변성 gel(30 cm×40 cm×0.3 mm)을 이용하여 gel 온도를 55℃로 설정, 55 W로 3시간 전기영동한다. AP-PCR 산물을 AP-PCR-SSCP법으로 해석하는 경우 5% glycerol을 함유하고 요소를 함유하지 않는 5% polyacrylamide 비변성 gel(30 cm×40 cm×0.3 mm)을 이용하여 15℃, 40W로 4시간 전기영동한다. 이 조건을 이용하면 두 가지 방법에서 거의 같은 DNA영역을 검출할 수 있다. 전기영동 후 gel을 가열 진공 건조시켜 고압도 X-ray 필름(Kodak XAR5™)에 14~24시간 노출시킨다.

AP-PCR법 및 AP-PCR-SSCP법으로 얻은 autoradiograph를 그림 2에 나타내었다. Human *p53* 암 억제 유전자의 염기서열 일부를 primer로 18명의 환자에 유래하는 간암 세포 및 비 간암조직 DNA에서 얻은 fingerprint이다. 두 가닥 DNA 단편과 그 조직의 대응하는 부분을 선으로 표시하였다. 두가닥 DNA의 대부분이 상보가닥으로 분리되어 AP-PCR-SSCP법에서 band수는 AP-PCR법의 약 2배가 된다.

4. AP-PCR-SSCP법에 의한 DNA 결실 검출

AP-PCR-SSCP법으로 검출한 DNA 결실예를 그림 3에 나타내었다. AP-PCR-SSCP법에서 증폭 DNA 단편중에 다형이 존재하는 경우, hetero 접합체는 통상 네 개의 밴드를 나타내지만, LOH는 그 중 두 개의 결실로 검출된다. LOH를 band signal의 미묘한 농도 차로 추정해야 하는 AP-PCR법과는 달리 AP-PCR-SSCP법에서는 다형의 존재로 분리된 DNA 단편의 signal 소실을 관찰하므로 LOH의 판정이 쉽다.

실제 screening에 있어서 다수 band의 밀집으로 hetero 접합성을 나타내는 DNA 단편의 동정이 곤란한 경우가 많다. 그러나 어느 하나의 band에서 signal이 없다면 LOH를 의심할 수 있다. 즉 소실된 signal에 대응하는 band를 포함하는 gel에서 DNA를 추출, 그 염기서열을 결정하고 다시 2개의 특이적 primer를 사용하여 PCR-

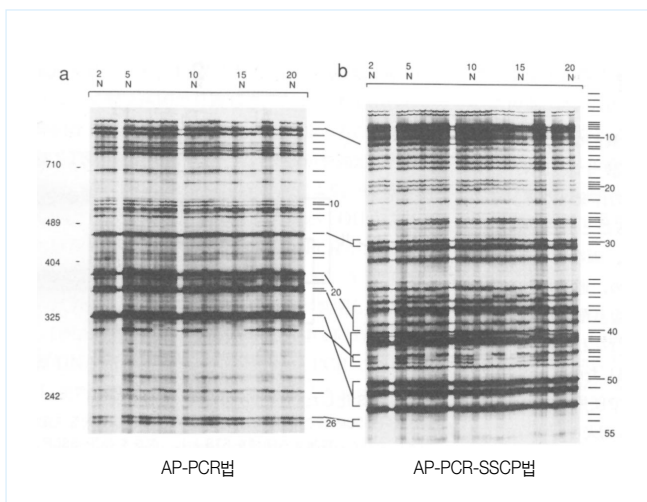


그림 2 AP-PCR법과 AP-PCR-SSCP법

AP-PCR (a) AP-PCR-SSCP법 (b)에 의한 해석 예
p53 유전자의 염기서열에서 20염기를 사용한 한 개의 primer AP3에 의한 결과이다. AP-PCR 해석 gel에서 각 band에 대응하는 DNA를 용출하여 재 증폭한 후 SSCP해석하여 DNA 단편과 상보가닥의 대응관계를 나타내었다.

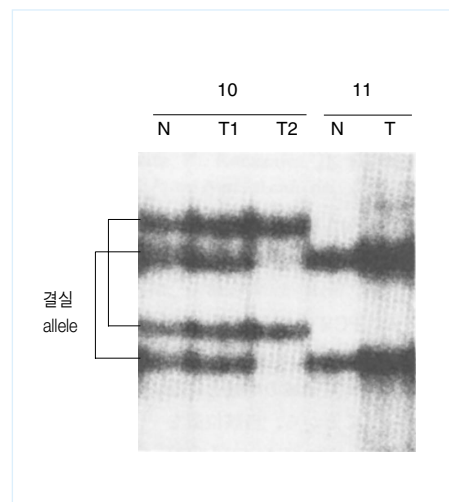


그림 3 AP-PCR-SSCP법에 의한 LOH 검출

그림 2 (b)에 해당하는 fingerprint를 별도의 primer를 제작하여 그 중에서 검출된 암 특이적 이상영역을 확대하여 나타내었다.

SSCP 해석을 하면 대부분의 경우 LOH의 존재를 확인할 수 있다. 이렇게 band signal의 소실은 대부분 LOH로 추정되지만 Y 염색체 및 남성 X 염색체상의 DNA 결실도 포함되어 있다.

5. AP-PCR 산물의 염기서열 결정

AP-PCR-SSCP법으로 종양 특이적 이상이 관찰된 경우, 그 이상의 확인 및 해당하는 DNA 단편 유래의 염색체 동정, DNA 단편의 염기서열을 결정해야 한다.

AP-PCR에서 얻어진 DNA 단편은 양 말단에 primer에서 유래하는 동일 염기서열을 갖고 있으므로 보통 cloning 한 후 vector내 primer를 이용하여 염기서열을 결정한다. DNA 단편을 상보적으로 분리한 후 얻어진 single strand DNA를 주형으로 AP-PCR에서 사용한 primer를 이용하여 직접 염기서열을 결정하였다. 이상 밴드에 대응하는 DNA를 용출한 후 이 용출액의 일부분(10 μ l)을 PCR(3 분간 denaturation 후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30 cycle)로 다시 증폭하여 polyacrylamide 비변성 gel(30 cm \times 40 cm \times 0.3 mm)에서 전기영동하여 single strand로 분리한다. Single strand DNA를 포함하는 gel 단편을 20~30 ml의 증류수에 넣어 42 $^{\circ}$ C에서 1분간 가열하여 DNA를 용출한다. Butanol로 DNA를 농축한 후, ethanol 침전으로 회수하여 주형으로 사용하여 그 염기서열을 결정하였다.

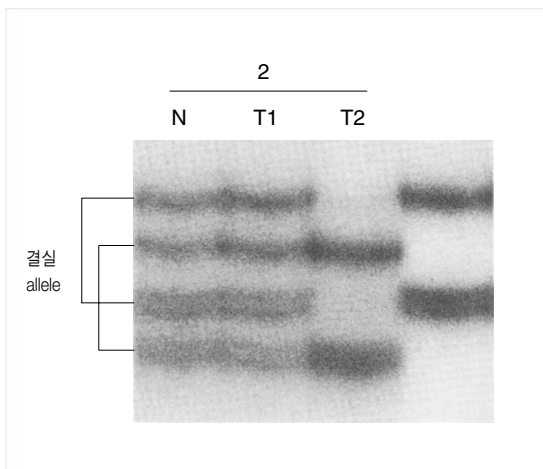


그림 4 STS화한 DNA단편의 LOH확인 예

AP-PCR-SSCP법에서 이상을 나타낸 DNA단편의 염기서열 결정으로 해당하는 영역을 STS화하고 결실을 PCR-SSCP법으로 확인하였다.

6. DNA 단편의 염색체 동정과 이상 확인

AP-PCR 산물의 염기 서열 결정은 두 개의 primer를 사용하여 특정 영역의 증폭을 가능하게 하며, 해당 위치를 STS(sequence-tagged site)로 사용할 수 있다. 이 두 개의 primer를 사용하여 이상 DNA 단편의 염색체를 동정할 수 있다. Human 염색체 한 개만을 갖고 있는 NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panel #1 and #2의 DNA(각 50 ng)를 주형으로 PCR한 후 증폭산물을 전기영동으로 분리하여 어느 panel에서 human 특이적 DNA 단편이 얻어지는가로 해당 STS가 어느 염색체상에 존재하는지 동정할 수 있다.

증폭한 STS의 PCR-SSCP법으로, AP-PCR-SSCP법으로 검출된 signal의 결실이 LOH임을 확인할 수 있다(그림 4). 또 AP-PCR-SSCP해석으로 signal의 소실을 나타낸 DNA 단편이 Y 염색체 또는 남성 X 염색체에서 유래함이 판명된 경우 DNA 결실의 확인은 같은 반응액에 내인성 대조 DNA 단편을 증폭하는 duplex PCR로 한다. PCR산물이 직접적으로 증폭되는 24 cycles 조건을 사용하여 대조 DNA 단편과 목적 X, Y 유래의 DNA단편이 증폭되고 그 PCR 산물량을 비교하여 결실을 확인한다.

▶맺음말 : AP-PCR-SSCP해석의 이점

23종류의 primer를 이용한 AP-PCR법 및 AP-PCR-SSCP법의 해석결과를 표 1에 정리하였다. AP-PCR에서는 한 개의 primer에서 평균 30개의 주요 밴드로 나타내는 DNA 단편이 전체 genome에서 증폭되었다. 이것을 SSCP로 해석하면 상보가닥으로 나뉘어 약 2배인 평균 55개의 band가 관찰되었다. 증폭된 DNA 단편은 한 개 primer당 약 17 kb이다. AP-PCR-SSCP법은 DNA단편 내의 염기치환으로 생기는 single strand DNA 고차 구조 다형으로 같은 길이의 DNA 단편을 다른 위치에 영동할 수 있으며 DNA 다형을 나타내는 밴드 수가 AP-PCR 해석에 비해 약 5배로 DNA 결실 검출 확률이 그만큼 높아지는 이점을 갖고 있다. AP-PCR에서 증폭된 DNA 단편을 cloning하지 않고 염기서열을 직접 결정하는 방법으로 해당 DNA 단편을 STS화 할 수 있으며 DNA 결실 확인, 유래한 염색체의 동정도 아주 간단하다. STS는 해당하는 유전자 탐색의 중요한 기점이 된다.

AP-PCR-SSCP법은 해석대상의 염기 서열 정보 없이 높은 DNA 다형을 검출하는 능력이 있으므로 LOH를 시작

표 1 AP-PCR 및 AP-PCR-SSCP법으로 얻어진 band수

| Primer | Band수 | | 추정해석영역 (kb) | 다형 표시 band수 | |
|---------|--------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| | AP-PCR | AP-PCR-SSCP | | AP-PCR | AP-PCR-SSCP |
| AP1 | 23 | 52 | 11 | 1 | 12 |
| AP2 | 32 | 61 | 17 | 3 | 10 |
| AP3 | 26 | 55 | 14 | 2 | 7 |
| AP4 | 27 | 48 | 16 | 3 | 6 |
| AP5 | 19 | 48 | 11 | 0 | 6 |
| AP6 | 27 | 57 | 15 | 2 | 6 |
| AP7 | 19 | 52 | 11 | 4 | 16 |
| AP8 | 28 | 54 | 16 | 2 | 10 |
| AP9 | 38 | 72 | 20 | 1 | 14 |
| AP10 | 33 | 50 | 18 | 0 | 7 |
| AP11 | 30 | 66 | 17 | 2 | 12 |
| AP12 | 37 | 56 | 19 | 3 | 8 |
| AP13 | 34 | 58 | 20 | 4 | 8 |
| AP14 | 34 | 58 | 17 | 3 | 9 |
| AP15 | 38 | 62 | 20 | 1 | 8 |
| MCG1 | 31 | 52 | 18 | 3 | 7 |
| K3US | 24 | 52 | 14 | 2 | 10 |
| TK1 | 46 | 62 | 25 | 3 | 8 |
| LH2 | 45 | 74 | 22 | 2 | 12 |
| MUTSQ6 | 26 | 44 | 15 | 2 | 10 |
| MUTSQ7 | 21 | 46 | 12 | 2 | 18 |
| MUTSQ8 | 31 | 50 | 18 | 4 | 6 |
| MUTSQ11 | 27 | 42 | 16 | 1 | 6 |
| 평균 | 30 | 55 | 17 | 2 | 9 |

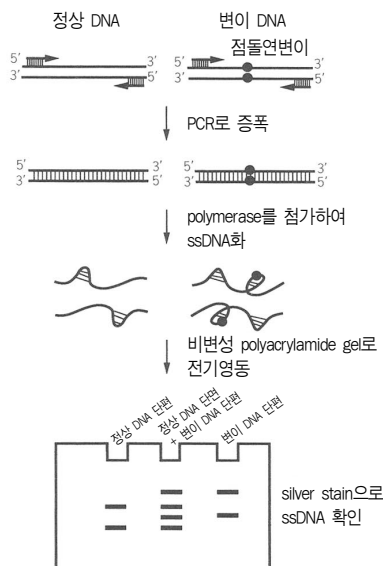
으로 하는 genome상의 다수 미지영역에서 암 부위 특이적인 변화를 검출하는 광범위한 DNA 이상 유무 검출법으로 유용하다.

II. 비방사성 표식 PCR-SSCP에 의한 암 DNA의 임상검사

암에 대한 지속적인 연구로 암 발생에 많은 암 유전자 또는 암 억제 유전자의 이상이 관련되어 있다고 밝혀지고 있다. 점 돌연변이 또는 염색체 결실 등 유전자 이상 검출은 각종 암 유전자나 암 억제유전자 등의 이상을 진단하는데 중요한 기술이다. 그러나 기존의 분자생물학적 방법은 복잡하고 방사성 동위원소 등 특수한 설비와 시설이 필요하여 일반적인 임상검사로 사용하기에는 부적합하였다.

유전자 진단을 일반적인 검사로 실용화하기 위한 시스템으로 minigel을 사용한 silver stain이나 형광 sequencer 등을 이용한 non-isotope PCR-SSCP법이 도입되어 점 돌연변이, 각종 유전자 다형, 염색체 결실 등을 검출하고 있다. 비방사성 표식 PCR-SSCP(non-RI SSCP)법은 PCR 종료 후 수 시간 안에 결과를 볼 수 있으며 일단 적절한 전기영동 조건을 설정하면 매우 간편하고 재현성이 뛰어나다. 본 고에서는 non-RI SSCP법을 이용한 암 유전자해석에 대하여 소개한다.

(i) Minigel과 silver stain을 이용한 PCR-SSCP법



(ii) 형광 sequencer를 이용한 PCR-SSCP법

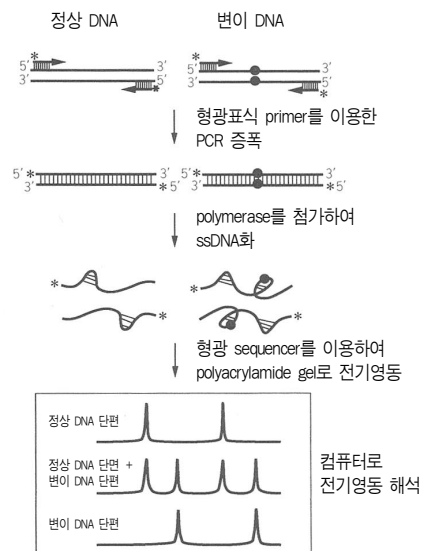


그림 1 비방사성 표식 PCR-SSCP(non-RI SSCP) 법의 원리

1. 비방사성표식 PCR-SSCP(non-RS SSCP)법으로 암 DNA의 임상검사

(1) Non-RS SSCP법의 원리

PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism analysis)법은 PCR산물에 formamide 등의 변성제를 첨가하여 한가닥 DNA(single strand DNA)로 변성시켜 비변성 polyacrylamide gel에서 전기영동하는 방법이다. ssDNA는 전기영동 중에 그 염기서열에 특유의 고차구조를 가지며 전기영동시에 고유한 이동도를 나타낸다(그림 1)¹³⁾. 그러나 하나의 염기치환 또는 짧은 염기서열의 결실, 삽입 등의 구조이상이 존재하면 ssDNA의 이동도가 변화하여 다른 밴드 형태를 나타내는 성질로 검출할 수 있다.

종래에는 primer 5' 말단을 ³²P 등으로 표식하여 PCR 하거나 PCR 반응액중에 ³²P 표식 dNTP 등을 첨가하여 ³²P 표식 DNA단편을 얻어 이것을 sequencing용 대형 gel로 전기영동하여 autoradiograph한 후 DNA 이상을 검사하였다. Non-RS SSCP법은 RS를 사용하지 않고 SSCP하는 방법으로, 소형 minigel을 사용하여 전기영동한 후 silver stain으로 직접 gel 속의 ssDNA를 확인하거나¹⁴⁻¹⁸⁾ 형광 표식 primer를 사용하여 PCR 후 형광 sequencer 등으로 signal을 검출하는 방법이 있다(그림 1).

(2) Minigel과 silver stain을 이용한 PCR-SSCP법

Minigel과 silver stain을 이용한 PCR-SSCP법은 다음과 같은 이점이 있다. ① gel이 소형이므로 취급이 용이하며 통상 PCR산물 그대로 염색할 수 있다. ② 고농도 polyacrylamide gel을 사용하므로 분리능이 뛰어나고 선명한 single strand DNA band를 얻을 수 있다. ③ PCR 종료 후 2시간 30분이면 결과를 얻을 수 있다(최적 전기영동 시간은 증폭하는 DNA 단편의 분자량 등에 따라 다르다). 그러나 해석 가능한 DNA 단편의 길이가 기존의 방법에 비하여 짧은 단점이 있다.

방사성 동위원소와 sequencing gel을 사용한 SSCP법의 경우, 약 300 bp 정도까지 분석할 수 있으나 minigel을 사용한 non-RS SSCP법은 150 bp 정도의 비교적 짧은 DNA 단편 해석에 유용하다. 따라서 목적 유전자를 PCR로 증폭할 경우 100 bp에서 130 bp 전후의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 primer를 설정해야 한다.

Non-RS SSCP법에 이용하는 전기영동 장치는 소형 mini slab gel 전기영동조로, 해석시에는 영동조의 gel 온도조절이 매우 중요하다. 본 고에서는 시판되고 있는 전기영동조를 개량하여 사용하였다. 즉 상부전극조가 깊고 gel판의 전면에 닿을 수 있는 전기영동 장치를 이용하였으며, 상부 전극조 내에 glass pipe를 냉각장치로 넣어 이 속을 water chiller를 이용하여 냉매(물)를 순환시켜 영동중의 온도변화를 항상 조절할 수 있도록 하고 있다. 이 때 상부 전극조 내에 설치한 온도계로 전기영동 중의 gel 온도를 모니터 한다.

분리 최적 조건은 목적 DNA 단편에 따라 다르나 일반적으로 18~23℃ 정도가 가장 많다. 그러나 적절하게 분리되지 않을 경우는 4~26℃ 전후까지 여러 온도를 검토하여 조건을 설정해야 한다. 전기영동 종료 후 목적 ssDNA를 확인하기 위하여 silver stain을 이용한다. Non-RS SSCP법으로 K-ras 암 유전자 codon 12의 각 점 돌연변이를 검출한 예를 나타내었다(그림 2). Non-RS SSCP법의 주의사항을 표 1에 정리하였다.

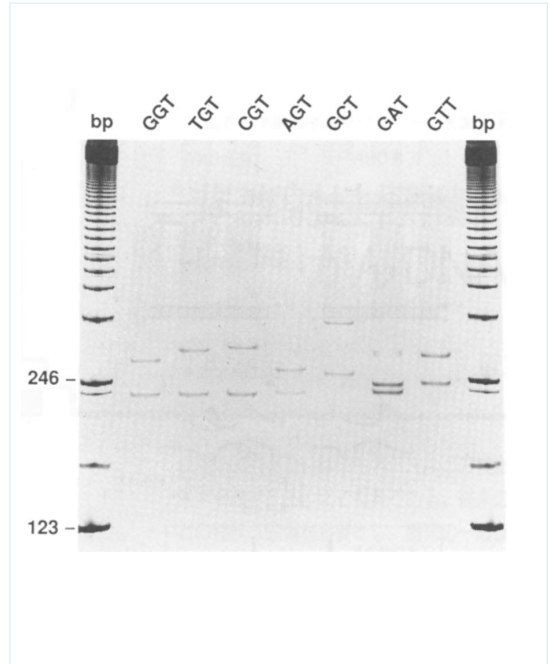


그림 2 non-RS SSCP법으로 K-ras 암 유전자 codon 12의 점 돌연변이 검출

정상형 K-ras plasmid(GGT) 및 codon 12의 각종 변이형 plasmid를 주형으로 PCR 반응 후 non-RS SSCP법을 하였다.

표 1 Minigel과 silver stain을 사용한 non-RI SSCP법의 주의사항

- (i) 영동용 gel
 - Polyacrylamide gel(acrylamide와 bis의 비율은 30:1로 한다.)
 - Gel 농도는 목적 PCR산물의 분자량에 따라 다르다.
 - 10% 250~350 bp 정도
 - 12% 100~200 bp
 - 15% 100~150 bp
 - Buffer은 Tris-glycine buffer(25 mM Tris, 192 mM Glycine)을 이용한다.
- (ii) Formamide 용액

탈이온 처리한 90% formamide 용액에 20 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xyleneecyanol을 함유하는 용액을 이용한다. 위 formamide 용액 10 μ l 에 PCR산물을 2 μ l 첨가하고 80℃, 5분 가열 후 10 μ l를 각 lane에 loading한다.
- (iii) 전기영동 조건

전기영동은 보통 200 V 또는 300 V 정도에서 실시한다. 전기영동 시간은 목적하는 single strand DNA의 분리 상태에 따라 다르지만 보통 1시간 30분에서 3시간 정도가 대부분이다.
- (iv) 전기영동 중의 온도조절
 - 18~23℃로 사용한다.
 - 저온(4℃ 정도까지) 또는 고온(30℃ 정도까지)에서 검토 후 조건을 설정한다.
- (v) Gel 보존

Silver stain 후 gel은 gel drying frame 또는 gel dryer를 사용하여 건조한다. SSCP용 gel은 농도가 높고 bis 비율이 높아 찢어지기 쉬운 결점이 있다. 따라서 기록보존용으로는 silver stain 종료 후 건조시키기 전에 gel 사진을 찍어 두는 것이 좋다.

(3) 온도 기울기 SSCP법(TG-SSCP법)으로 영동조건 최적화 및 유전자 이상 검출

Non-RI SSCP법으로 변이 DNA를 검출할 때 목적 ssDNA의 분리가 최적조건에서 이루어지지 않는 문제점이 있다. Non-RI SSCP법의 최적 전기영동 조건은 대부분 경험적으로 설정되며 ssDNA의 고차구조는 전기영동 중의 온도변화에 많은 영향을 받으므로 변이를 깨끗하게 분리하기 위하여 전기영동 조건, 특히 온도를 바뀌가며 반복적으로 전기영동 하는 것이 중요하다.

이 문제점을 해결하기 위하여 전기영동 중인 gel 온도를 단계적으로 변화시켜 전기영동 방향에 직각으로 온도 기울기

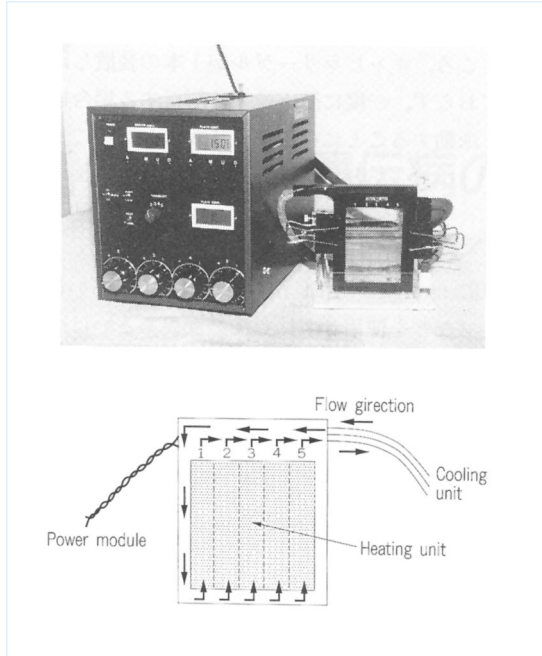


그림 3 온도기울기 SSCP(TG-SSCP)법에 사용하는 온도기울기 plate(Kitazato supply사)와 그 구조도

Plate 안쪽에 냉각수를 순환시켜 plate를 냉각하면서 plate 표면에 접촉되어 금속박막에 전기를 통하게 하여 발열시키므로 gel 표면의 온도를 조절하는 구조로 되어 있다.

를 형성시키며 SSCP할 수 있는 전기영동장치를 개발하였다(그림 3)¹⁹⁾.

본 장치를 이용하여 K-ras 암 유전자 codon 12에 점 돌연변이를 갖지 않는 정상형 K-ras와 codon 12에 glycine(GGT)에서 arginine(GGT) 또는 asparagine(GAT) 점 돌연변이된 K-ras PCR산물을 혼합하여 전기영동한 것을 나타내었다(그림 4a, b, c). 정상형 K-ras(GGT)의 두 개의 ssDNA는 저온에서 고온으로 감에 따라 넓게 분리되게 된다(그림 4a).

한편 화살로 표시된 변이형 DNA(GAT)는 저온(16℃)에서는 정상형의 이동도가 늦은 밴드와 거의 같은 이동도를 보이고 온도가 올라감에 따라 조금씩 정상형의 두 개의 ssDNA band 사이 위치에서 분리되었다. 20℃ 전후까지는 변이형 DNA(GAT)의 두 개의 ssDNA 중 한 개는 정상형 K-ras의 이동도가 늦은 band와 함께 영동되므로 변이형 band는 한 개 밖에 검출되지 않지만 22℃ 이상의 고온에서는 두 개로 분리되고 정상형과 합쳐져 네 개의 ssDNA band가 검출된다(그림 4b). 따라서 non-RI SSCP법으로

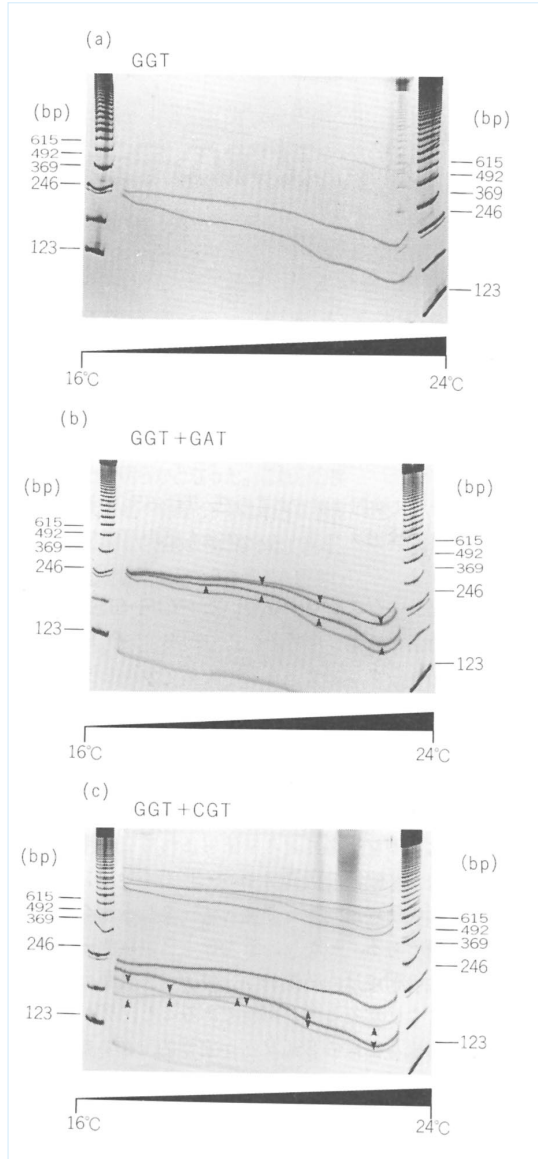


그림 4 온도기울기 SSCP(TG-SSCP)법에 의한 해석

Gel의 왼쪽은 16℃ 오른쪽은 24℃로 설정되어 있으며 오른쪽을 향해 2℃씩 단계적으로 gel 표면 온도가 상승하는 구조로 되어있다.

변이형 K-ras에 유래하는 두 개의 ssDNA 밴드를 화살표로 나타내었다.

(a) 정상형 K-ras 암유전자 exon 1의 PCR산물(108 bp) TG-SSCP 해석 (b) 정상형 K-ras 암유전자와 변이형 K-ras 암유전자 [codon 12에 GGT→GAT(Asp)의 점 돌연변이를 혼합한 TG-SSCP 해석 (c) 정상형 K-ras 암유전자와 변이형 K-ras 암유전자 [codon 12에 GGT(Gly)→CGT(Arg)의 점 돌연변이를 혼합한 TG-SSCP 해석

K-ras codon 12의 GGT→GAT의 점 돌연변이를 검출할 경우 온도설정을 22℃ 이상의 고온으로 하는 것이 좋다.

Glycine(GGT)에서 asparagine(CGT) 점 돌연변이(화살표로 표시한 변이형 K-ras)는 저온에서는 정상형 K-ras 보

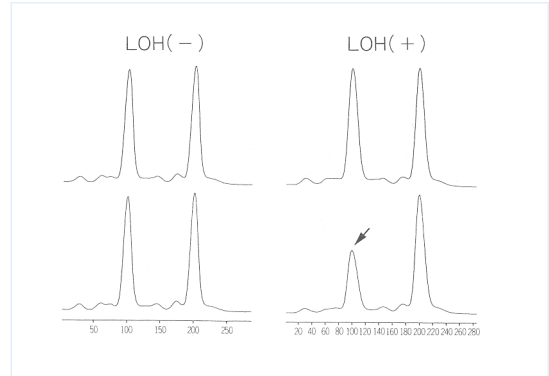


그림 5 형광 sequencer를 이용한 SSCP해석으로 p53 암 억제유전자 intron 1의 LOH 검출

화살표로 표시한 변성부위의 signal의 감소는 LOH를 나타낸다.

다 빠른 이동도를 나타내지만 온도가 18℃ 전후까지 상승하면서 두 개의 변이형 ssDNA 이동도가 역전하여 저온에서 이동도가 큰 밴드가 고온에서는 정상형 K-ras의 두 개의 ssDNA의 중간 이동도를 나타내었다(그림 4c).

이와 같이 온도변화가 ssDNA의 고차구조에 미치는 영향은 그 염기서열에 따라 크게 다르다. TG-SSCP법은 목적 염기서열의 분리조건을 최적화하는데 유용하며 p53 암 유전자와 같이 random하게 점 돌연변이가 생기는 경우 광범위한 온도조건을 한번에 검사할 수 있어 미지의 점 돌연변이의 screening에도 응용할 수 있다¹⁹⁾.

(4) 형광 sequencer를 이용한 PCR-SSCP법

형광 색소로 표식한 primer를 이용하여 PCR한 후 형광 sequencer를 이용하여 signal을 검출하는 것으로 non-RF 조건에서 SSCP할 수 있다. 이 경우 형광 primer의 합성과 고가의 형광 sequencer가 필요하다.

기초연구실의 형광 sequencer는 plasmid 등의 염기서열 결정에 사용되어 빈 시간이 거의 없고, 임상실험실에서 SSCP 또는 단편 해석 전용으로 형광 sequencer를 갖추기에는 상당히 고가이다. 그러나 형광 sequencer를 사용할 경우 결과가 컴퓨터 화면으로 표시되어 바로 알 수 있으며 gel의 해독을 기본으로 하는 기존 SSCP법이 정성적인데 반해 컴퓨터 처리로 정량적인 해석이 가능한 이점이 있다. 형광 sequencer의 정량성을 이용하여 각 염색체 서열에 존재하는 다형 부위를 PCR-SSCP 해석으로 각 형질 signal 강도를 비교하여 LOH(loss of heterozygosity)의 검출에 응용할 수 있다(그림 5)²⁰⁾.

(5) 그 밖의 방법

차세대 방식으로 capillary gel 전기영동 등을 이용한 PCR-SSCP법이 보고되어 있다. gel의 제작, 시료의 첨가 등이 자동화되어 있어 재현성이 높은 이점이 있으나 한번에 수십 검체를 해석할 경우는 반복적으로 전기영동을 하여야 하는 번거로움이 있으며 시간이 많이 소요된다.

▶ 맺음말

Non-RI SSCP법은 특수한 설비 또는 RI를 사용하지 않고 점 돌연변이와 유전자 다형 등 임상연구에서 각종질환을 대상으로 유전자를 해석할 수 있어 유용하다. 그러나 300 bp 전후의 비교적 긴 DNA 단편 해석에는 현재 sequencing gel과 RI를 사용한 기존방법이 효율적이라고 판단되며 보다 많은 개량이 필요하다. ssDNA의 이동도는 전기영동중의 gel 온도에 크게 의존하고 있어 TG-SSCP법을 이용하면 기지 점 돌연변이와 유전자 다형의 분리조건 빨리 최적화할 수 있다. 형광 sequencer를 사용한 SSCP 해석은 date처리의 자동화와 정량 해석이 가능하여 앞으로 기기 보급과 함께 널리 이용될 것이다.



참고문헌

- Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S., Sekiya, T.: *Cancer Res.*, **51**, 5520-5525 (1991)
- Zhang, X., Xu, H.-J., Murakami, Y., Sachse, R., Yashima, K., Hirohashi, S., Hu, S.-X., Benedict, W.F., Sekiya, T.: *Cancer Res.*, **54**, 4177-4182 (1994)
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J., Ozturk, M.: *Nature*, **350**, 429-431 (1991)
- Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J., Harris, C.C.: *Nature*, **350**, 427-428 (1991)
- Kuroki, T., Fujiwara, Y., Tsuchiya, E., Nakamori, S., Imaoka, S., Kanematsu, T., Nakamura, Y.: *Genes Chrom. Cancer*, **13**, 163-167 (1995)
- Welsh, J., McClelland, M.: *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213-7218 (1990)
- Ionv, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M.: *Nature*, **363**, 558-561 (1993)
- Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., Perucho, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10065-10069 (1992)
- Kohn, T., Morishita, K., Takano, H., Shapiro, D. N., Yokota, J.: *Oncogene*, **9**, 103-108 (1994)
- Orita, M., Iwahara, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989)
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: *Genomics*, **5**, 874-879 (1989)
- Blin, N., Stafford, D. M.: *Nucl. Acid Res.*, **3**, 2303-2308 (1976)
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: *Genomics*, **5**, 874-879 (1989)
- Sugano, K., Kyogoku, A., Fukayama, N., Ohkura, H., Shimosato, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: *Lab. Invest.*, **68**, 361-366 (1993)
- Tokue, Y., Sugano, K.: *Chemotherapy*, **42**, 283-289 (1994)
- Sugano, K.: *Oncologia*, **27**, 458-461 (1994)
- Kondo, H., Sugano, K., Fukayama, N., Kyogoku, A., Nose, H., Shimada, K., Ohkura, H., Ohtsu, A., Yoshida, S., Shimosato, Y.: *Cancer*, **73**, 1590-1594 (1994)
- Tokue, Y., Sugano, K., Saito, D., Noda, T., Ohkura, H., Shimosato, Y., Sekiya, T.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 428-431 (1994)
- Sugano, K., Fukayama, N., Ohkura, H., Shimosato, Y., Yamada, Y., Inoue, T., Sekiya, T., hayashi, K.: *Electrophoresis*, **16**, 8-10 (1995)
- Sugano, K., Nakashima, Y., Yamaguchi, K., Fukayama, N., Yamaguchi, M., Ohkura, H., Kakizoe, T., Sekiya, T.: *Genes Chromosome Cancer*, (1996)

유전병의 원인 유전자 해독

Triplet repeat 신장은 새로운 변이종으로, 지금까지 신경과 관련한 여러종류의 질환에서 발견되고 있다. Repeat 신장정도와 발병 연령은 역상관 관계에 있고, 부모(질환에 의함)로부터 전달되면 한층 더 신장되는 것으로 알려져있다. 동일한 가계라도 세대를 거치면서 유년발병 · 중증화하는 표현축진현상이 공통적으로 관찰되고, 이는 신장 repeat의 추가 신장으로 설명된다. 현재 신장 repeat의 불안전성 분자구조와, 특정 영역에서의 신경세포사멸에 대한 분자구조 연구가 활발하게 진행되고 있다.

DNA 재조합기술이 발전함에 따라 인간과 같은 복잡한 genome을 가진 생물의 유전자 분석이 가능해지고, 또한 PCR법으로 미세한 변이를 쉽게 동정할 수 있어, 유전병이나 종양 등 질환원인유전자의 동정이 활발히 진행되고 있다. 변이를 염기서열수준에서 밝혀내어 진단에 이용하도록 병 상태와 병리를 이해하고, 유전자정보에 근거한 치료법을 개발하기 위한 연구가 진행중이다. 인간 genome은 5만 또는 10만 정도의 유전자가 존재하지만, 현재까지 기능이 밝혀진 인간 유전자는 약 3,000개로 이 중 약 1,000개의 유전자가 질환과 관련이 있다¹⁾. 많은 대사 질환에서처럼 생화학적 원인이 분명하면, 단백질이나 기능 등에 근거하여 원인유전자를 cloning할 수 있지만, 생화학적 원인이 알려진 질환의 수는 그리 많지 않다. 그래서 유전자 cloning의 새로운 전략인 positional cloning법이 등장하였다. 한가계에서 연쇄분석이나, 드물게 발견되는 염색체 이상 등, 원인유전자가 존재하는 염색체의 위치정보에 기초하여 해당영역을 검색하고, 최종적으로 원인유전자를 동정하는 방법이다. 최근 인간 게놈 프로젝트가 발전해감에 따라 DNA 다형 marker수가 비약적으로 증가하였으며, 작은 cM 정도의 인간유전자지도가 거의 완성되어 질환원인유전자의 분리·동정이 앞으로, 지속적으로 증가할 것으로 기대된다.

질환유전자 중 최근 가장 관심이 집중되는 분야는 triplet repeat의 신장으로 새로운 변이가 발견되어, 기존의 이론으로 설명이 불가능 했던 표현축진(genetic anticipation), 유전현상의 설명이 가능하게 되었으며, 암 또는 노화 등과 관련하여 주목을 끌고 있다. DNA 다형 marker를 사용해서 최초로 mapping된 huntington disease도 triplet repeat의 신장에 의한 질환이고²⁾, 또 Fragile X Syndrome도 동일한 원인이다³⁻⁵⁾.

저자는 외국에서 드문병이나, 일본에서는 많이 보이는 Dentatorubral and Pallidoluysian Atrophy; DRPLA에 삼염색체 우성 유전 신경변성질환인에 대해 mapping하여 가능성 높은 영역에서 후보유전자를 선택하여 DRPLA가 triplet repeat의 신장에 기인하는 것을 발견하였다⁶⁾.

거의 동시에 니이가타대학 쓰지교수 그룹도 동일한 결과를 얻었다⁷⁾. 저자는 그 후 DRPLA 원인유전자의 cDNA와 genome 구조를 밝혀⁸⁾, 단백질 산물을 동정하고⁹⁾, 진화에 있어 repeat 신장과정을 밝혀¹⁰⁾, DRPLA 관련 연구를 이끌고 있다^{11, 12)}.

1. Triplet repeat 신장 발견

지금까지 triplet 신장은 여러종류의 질환에서 발견되고 있다(표 1 참조). 질병명은 표 1에 기재한 약호를 사용한다. Triplet repeat가 신장하는 부위는 표 1외에 FRAXF(Xq28), FRA16A(16p13.11), FRA11B(11q23.3)로도 알려져 있지만 질환은 수반하지 않는다¹³⁻¹⁶⁾. 또한 분자 병리적으로는 동일하지만 다른 질환 명을 가진 경우는 같은 종류로 본다. 최초에 SBMA와 FRAXA의 repeat 신장은 거의 같은 시기에 발견되었으나, 개인적으로는, La Spada가 발견한 SBMA 신장¹⁷⁾이 먼저 발견되었다고 생각된다. SBMA는 환자수도 적고 연구자수도 적었으며 당시(또는 현재에도) SBMA 병상태와 원인 유전자인 androgen receptor와의 관계를 연결짓기 어려웠다. 이에 비해서 FRAXA는 환자수가 많고 당시 많은 연구실이 경쟁적으로 원인유전자 분리를 진행하고 있었다. 또한 연구결과가 축적되어 repeat 신장은 쉽게 인정 받았다. 실제 FRAXA의 repeat 신장이 SBMA보다 먼저 논문으로 발표되었다^{3, 4, 17)}.

많은 연구실에서 거의 동시에 보고 하였지만 Sutherland 그룹이 최초로 repeat 신장을 밝혔다. 또한 triplet repeat 신장에 수반하는 중요한 개념인 표현축진현상과의 관계에도 FRAXA의 공헌이 크고, 많은 총설에서 FRAXA를 triplet repeat의 신장의 제 1예로 들고 있다.

2. Triplet repeat 신장병 분류

질환유전자에서 신장하고 있는 repeat는 CAG, CTG, CCG의 3종류이다. 이것은 모두 CNG라고 하는 기본 서열이 반복되는 서열로, CG가 풍부한 공통점이 있다. AT가 풍부한 triplet repeat는 신장하지 않거나, 질환과 관련이 없어 현재까지 동정되지 않았다. DNA가 두가닥임을 감안하면, CAG repeat와 CTG repeat는 DNA상에서 완전히 동일하고, 또 CCG repeat는 CCG, CGC, GCC, CGG, GGC나 GCG repeat로 부를 수 있다. 이러한 혼란을 피하기 위하여 Sutherland는 신장하는 repeat를 알파벳순으로 부르며 CAG, CTG repeat는 AGC repeat로, 나머지는 CCG repeat로 분류할 수 있다. 연구가 진전됨에 따라 CAG repeat는 translation region에 존재하고, CAG는 Gln을 코딩하므로 기능과의 관련을 중시하여 CAG, CTG, CCG의 3군으로 분류하고자 한다.

표1 Triplet repeat의 신장이 원인이 되는 유전병

| 질 환 | 유전자 위치 | 반복 서열 | 정상 횟수 | 환자 횟수 | 유전 양식 | 부모 | 중간체 | 창시자 염색체 | mRNA (kb) | Repeat의 유전자내위치 | 유전자기능 | Transgenic Mouse | 주요 문헌 |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|----|-----|-------------|-----------|----------------------------------|--------------------|--|-------|
| Dentatorubral pallidolysian atrophy (DRPLA) | DRPLA 12p13,13 | CAG | 7~23 | 49~75 | 우성 | 부친 | 있음 | 세계 공통 | 4.5 | translation region polyglutamine | DRPLAprotein 분자량증가 | | 6-12 |
| Huntington chorea (HD) | HD 4p16,3 | CAG | 11~34 | 37~86 | 우성 | 부친 | 있음 | 다경로 | 10 | translation region Polyglutamine | Huntingtin 분자량증가 | long repeat >변화없음 knock out >essential | 2 |
| Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1) | SCA1 6p23 | CAG | 23~36 | 43~81 | 우성 | 부친 | | | 11 | translation region Polyglutamine | Ataxin-1 분자량증가 | long repeat >병상태 | 23 |
| Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) | AR Xq11,2-q12 | CAG | 17~26 | 40~52 | 우성 | | | | 3.6 | translation region Polyglutamine | Androgen 수용체 | long repeat | 17 |
| Machado joseph disease (MJD) | MJD1 14q24,3-32 | CAG | 13~36 | 68~79 | 우성 | | | | 1.8 | translation region Polyglutamine | | | 24 |
| Fragile site mental retardation (FRAX) | FRAXA Xq27,3 | CGG | 6~54 | >130 | 우성 | 모친 | 있음 | 다기원 | 4.4 | 5'-non-translation Methy 회축진 | FMR-1 RNA결 합단백질 | knock out >병상태 | 3~5 |
| | FRAXE Xq28 | GCC | 6~25 | >200 | 열성 | | | | | non-translation Methy 회축진 | | | 13 |
| Dystrophia myotonica(DM) | DM 19q13,3 | CTG | 5~27 | >50 | 우성 | 양친 | 있음 | 세계 공통 +다른경로 | 3.0 ~3,3 | non-translation | 단백질 kinase | | 36-38 |

Triplet repeat의 신장이 원인이 되는 8종류의 유전병, 각각의 repeat특징을 비교하였다.

3. 각 repeat 공통 사항

(1) 다형

2~4염기를 단위로 하는 반복서열을 microsatellite라 하며, PCR법의 개발로 쉽게 검출할 수 있다. 또한 고등생물의 genome 중에 다수 존재하며 그 대부분은 고도의 다형성을 나타내 DNA 해석에서 유용한 marker로 사용되고 있다. 다형(polymorphism)은 “동일의 생물종, 또는 그 집단에서 다른 유전적 성질이 공존하는 것”으로 정의할 수 있으며 유전적 성질의 개인차(엄밀히 말하면 대립유전자간의 차)를 나타낸다. Triplet repeat 신장병의 원인유전자 repeat는 정상인 집단에서 고도의 다형성을 보이고, 반복되는 수는 거의 50회까지 일정 범위내에 분포하고 있다. 그러나 환자인 경우 반복하는 수가 지속적으로 증가하여 repeat가 신장하고 있다. 2~4염기를 단위로 하는 microsatellite도 고도의 다형성을 보이며 100회 정도까지 반복수가 증가한 repeat는 거의 알려져 있지 않고, 질환과

관련된 예도 알려지지 않았으므로 triplet repeat만 신장한다는 결론은 아직 이르다. 수십, 수백 bp나 더 큰 크기를 단위로 하는 반복서열에서는 100회 이상의 반복을 가진 예가 알려져 있다. 예를 들면 Y염색체 장완에 위치하는 DYZI는 질병과는 관계 없지만, 3.4 kb단위가 사람에게 따라서는 100회 이상 반복되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

(2) 표현축진

Triplet repeat 신장병에는 표현축진현상(genetic anticipation)이 알려져 있다. 즉 같은 가계에 속하는 환자라도 병의 상태가 다르고, 세대를 거치면서 발증 연령이 낮아지거나 증상이 심각해지는 현상이다. 표현축진이 가장 눈에 띄는 질환은 DRPLA이다.

DRPLA는 병리학적 조건에 근거한 이름으로, 소뇌치상핵, 소뇌의 원심로에 해당하는 척핵, 대뇌기저핵인 치밀구와 루이체를 중심으로 한 신경세포의 변성사에 근거한 위축성 변이이다¹⁹⁻²²⁾.

소뇌실조로 extrapyramidal signs인 불수의 운동

(Athetosis나 Chorea)을 나타내며 환자에 따라 병상태가 눈에 띄게 다르므로, 진단이 곤란한 경우가 있다. 그러나 점차적으로 표현촉진현상을 수반하는 질환으로 특히 60세 정도에서 발증하는 경우, 치매, 불수의운동, 경도의 소뇌실조를 일으키는 경우가 많고, 때로는 Huntington Chorea와 구별하여 진단하기 어려운 반면 유년발증할 경우, Myoclonus Epilepsy를 주된 증상으로 하는 경우가 많다. DRPLA 유전자의 CAG repeat는 정상인의 경우 7~23회 범위에서 반복되며, 일본인의 경우 10회 또는 17회 반복되는 2개의 대립유전자를 가진 사람이 가장 많다(그림 1). 환자는 유전자가 49~75회 정도로 신장하고 있다(그림 2). 환자의 발증연령과 repeat수의 관계, 부모로부터 유전된 질환 유전자의 repeat수 변화를 해석하여 표현촉진현상은 다음과 같이 설명할 수 있다. 그림 3과 같이 50회 정도로 신장하고 있는 사람은 60세 정도에서 발증하고, 60회 정도로 신장하고 있는 환자는 20~30세 정도에서 발증하며, 70회 정도에 신장하면 10세까지 발증하는 것과 같이 신장정도와 발증연령은 역상관 관계에 있다. 또한 신장한 질환유전자가 부친에서 자녀에게 유전되면 8회 정도 더 신장한다. 이러한 결과로 다음과 같은 상황을 살펴보자. 50회 정도 신장한 유전자를 가지고 60세 정도에 발증한 환자가 있다고 하자. 이 사람은 생식연령동안 자신이 유전병에 걸렸다고는 전혀 생각하지 않는다.

정상범위의 반복 수를 가진 대립유전자와 신장한 대립유전자가 자녀에게 전달 확률은 각각 50%로 동일하다. 만약

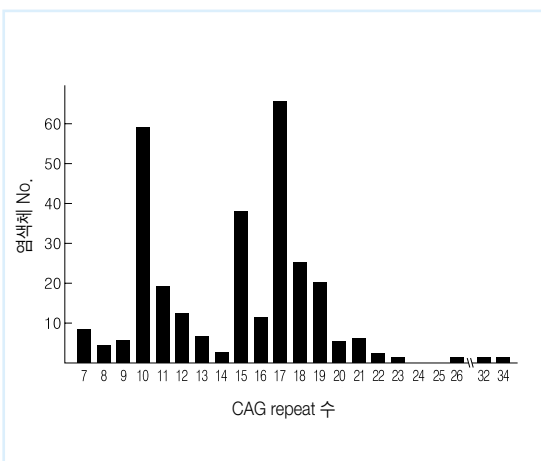


그림 1 정상 일본인 집단의 DRPLA 유전자 CAG repeat수의 분포[®]

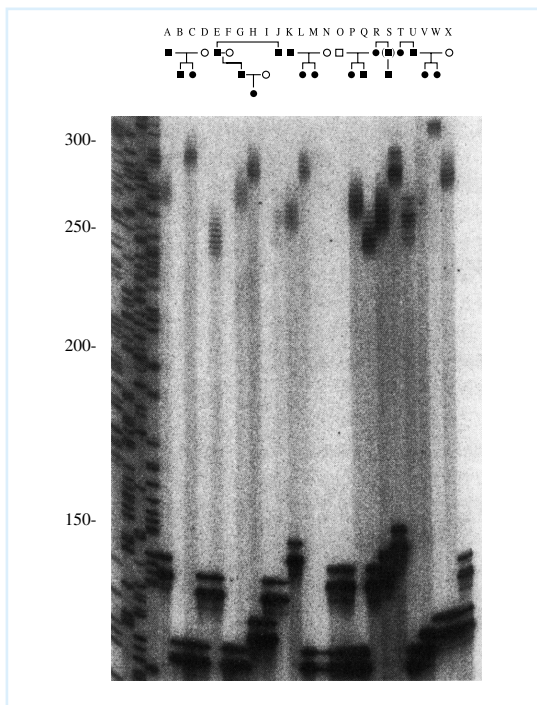


그림 2 DRPLA 환자의 한쪽의 대립유전자에 있어서의 CAG repeat 신장[®]

원인유전자 CAG repeat를 포함한 부위를 PCR법으로 증폭하여, 염기서열결정에서 이용되는 gel electrophoresis로 분석하였다.

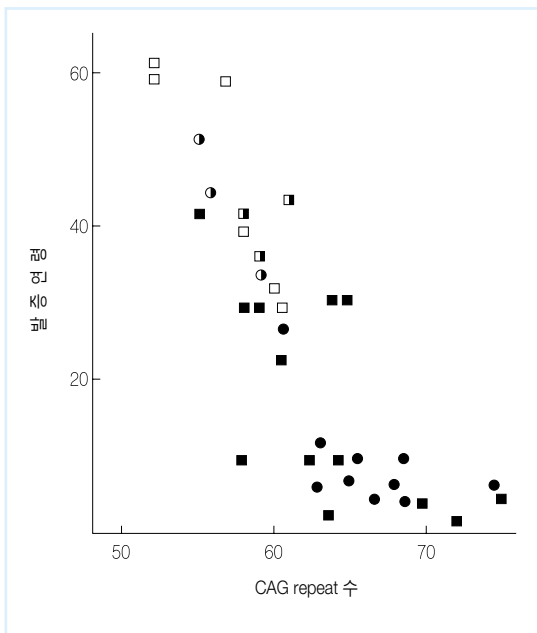


그림 3 환자의 DRPLA 유전자의 CAG repeat수와 발증연령(나이)와의 역상관[®]

□는 남성환자, ○는 여성환자, 검정색은 부친으로부터 질환유전자를 전달받은 환자, 반 검정색은 모친으로부터 질환유전자를 전달받은 환자, 투명한 것은 제1세대인지 불분명

환자가 남성이고, 신장한 대립유전자가 자녀에게 유전될 경우, 그 반복 수가 8회 정도 증가하므로 자녀는 58회 정도 신장한 DRPLA 유전자를 가지고 30~40세 정도에 발증해, 그 자손(제 1세대에서 보면 손자에 해당)에게 유전되면 64회 정도 신장하여 10대에서 발증한다. DRPLA의 질환유전자가 모친에서 자녀에게 유전되는 경우 신장정도가 거의 변하지 않거나, 경우에 따라서 여러 번의 축소를 발견한다. 그러나 모친으로부터 자녀에게 질환유전자가 전달되는 경우는 드물고 또는 임상적으로도 그러한 예는 드문 것이므로, 결과 해석에는 신중하여야 한다. 표 1에 기재한 8질환에 공통적으로 관찰되는 표현측진현상은 부친경유 또는 모친경유의 차이는 있지만 양쪽 모두 이같은 신장한 triplet repeat으로 설명할 수 있다.

4. CAG repeat 신장병의 특징

CAG repeat가 신장하는 질환은 표 1에 있는 것처럼 5종류가 알려져 있고, 모두 신경세포가 형성된 후 지연적으로 변성사하기 때문이다^{2, 6, 17, 23~24}.

DRPLA, HD, SCA1, MJD는 명확히 우성 유전을 보여준다. 또 기존에 열성으로 간주되던 SBMA도 최근 우성으로 판단되었다. 즉 2개의 대립유전자 중, 한쪽이 신장하고 있으면 발병한다. 부친으로부터 질환유전자를 전달 받을 때 보다 repeat가 신장되며 repeat 신장은 100회 정도의 한도가 있다. 남성환자의 정자 DNA에 대해 repeat 크기를 조사한 결과, 반복 수는 분산하고, 또 환자의 체세포와 비교할 때 약간 신장하므로 정자형성시기에 신장한 repeat가 불안정해진다고 생각된다²⁵. 그러나 HD, DRPLA, SCA1, MJD 환자로 각종의 조직에서 repeat 크기를 검토한 결과, 모두 체세포간에 약간의 크기 차이를 보이며, 수정란 이후의 발생분화단계에서도 불안정함이 알려져 있다^{26~28}.

이러한 질환원인유전자는 거의 모든 조직에서 발견할 수 있다. CAG repeat는 translation region에 존재하고, 번역틀은 glutamine에 해당한다. 실질적으로 신장한 repeat로 크기가 커진 단백질 산물을 DRPLA, SCA1, HD에서 검출했으나 양적변화는 볼 수 없었다^{9, 29~30}. 즉 repeat 신장에 수반되는 polyglutamine 사슬이 길어진 단백질이 형성된다고 생각된다. Polyglutamine 사슬을 가진 단백질의 대부분은 전사조절인자로 이런 질환원인유전자 산물도 전사에 관여할 것으로 기대되었으나, DRPLA, SCA1, HD는 기본적으로 세포질에 존재하므로 전사조절인자일 가능

성은 거의 없다.

Polyglutamine 사슬이 신장된 이상 단백질이 존재하면, 정상 단백질의 존재에도 불구하고 세포가 사멸한다. 또 mRNA로 보면 모든 조직에서 발현하여, polyglutamine 사슬이 신장된 단백질도 그 세포에 존재하지만, DRPLA은 추체 외로계(extrapyramidal system)를, HD는 미상핵을 중심으로 신경세포의 사멸여부(세포사멸이 일어나는 조직특이성을 결정)를 조사하는 것이다. 신경세포사멸의 조직특이성은, 각 단백질이 결합하는 상대 단백질의 조직특이성에 따르고, 그 부분에서 DRPLA는 arginin과 glutamate이 교대로 반복하는 모티브가 2군데 존재한다⁸). Spliceosome를 형성하는 RS 단백질은 arginin과 serine이 반복하는 서열로, 이 모티브가 단백질 상호작용에 중요하고, 또 serine잔기의 인산화 ((+)전하와 (-)전하가 교대된다)에 의해 조절을 받는다고 알려져 있다³¹. 최근 Ross 등은 Huntington(HD 단백질)과 상호 작용하는 단백질을 동정하고, 단백질 상호작용은 polyglutamine 사슬에 기인함을 밝혀냈다³².

5. CCG 및 CTG repeat 신장병의 특징

CCG가 신장하는 그룹은 염색체상에 취약부위를 나타낸다^{3~5, 33}. 질환을 수반하지 않지만 취약부위를 나타내는 repeat도 CCG를 단위로 하고 있다. 신장 repeat는 비번역부위에 존재하고, 신장되면 해당영역에 methyl화가 촉진되어, 원인유전자(FRAXA의 경우 FMR-1)의 발현이 억제되어 발병한다. 실질적으로 FRAXA는 repeat의 신장뿐만 아니라 FMR-1 유전자내의 결실에 의해서도 같은 병증을 나타낸다고 알려져 있다³⁴. 최근 repeat는 신장하지만 메틸화가 촉진되지 않는 예가 발견되었으며, 이 경우는 정상 표현형을 나타낸다³⁵. 따라서 repeat 신장과 메틸화 사이에는 다른 유전자가 관여하는 것으로 생각된다. 정상범위보다 반복수가 많지만 발증되지 않는 영역을 중간체라고 한다. 중간체 또는 신장 repeat가 모친으로부터 전달되면 repeat가 한층 신장되며 FRAXA는 반성 열성으로 알려져 있다. 남자자녀는 모친에게서만 X염색체를 받으므로 위의 분자구조와 일치하지만, 신장한 FRAXA repeat를 가진 여성도 가벼운 질환을 나타내므로, 열성이라는 표현은 적절하지 않을지도 모른다. 이렇게 CCG repeat 신장병을 분자병리학으로는 비교적 이해하기 쉽지만 repeat가 신장했을 때 형태적으로 염색체 취약부위를 형성하는 구조는 불명확하다.

Dystrophia Myotonica(DM)에서는 CTG repeat가 신장하여 비번역 부위에 존재하며³⁶⁻³⁸⁾, 유전자산물은 kinase활성을 가진다³⁹⁾. Repeat가 신장하면 전사 또는 mRNA의 안정성에 영향을 미친다고 보고 되어있지만, 단백질 생산량에는 영향을 주지 않는다⁴⁰⁾. 따라서 triplet repeat 신장병 중 DM은 어떤 분자기전에서 발병하는지를 판단하기 가장 힘든 질환이다.

FRA군과 DM에서 신장 repeat는 눈에 띄게 길고, 때로는 100회 이상 반복되며, 또한 환자의 체세포마다 다양한 길이를 가진다. 즉, 수정란 이후 발생분화단계에서 불안정하게 된다는 점을 시사하고 있다.

6. 창시자 염색체

정상인의 repeat 반복 수는 고도의 다형을 나타내는데 이것은 진화수준에서 반복 수가 때로 변화되는 것을 의미하며, 보통 세대간에서는 거의 안정적으로 전달 되어 자녀는 부모의 어느 한쪽 대립유전자와 같은 반복 수를 계승 받는다. 또한 질환 범위에서 신장한 반복 수는 불안정하고, 다음 세대에서는 한층 신장한 repeat가 된다.

“신장을 일으키는 다른 요인이 있습니까?”라는 질문을 자주 받는데, triplet repeat 자신이 DNA이므로 DNA합성에 관여하는 유전자는 당연히 관여하며, 정자 형성 시에 불안정하게 되는 경우에는, 그것을 규정하고 있는 어떤 요인이 있을 것으로 추측된다. 그러나, 이는 일반적(야생형)인 답변으로 질문자의 의도가 “특이 환자의 경우” 요인이라면 답변이 달라질 것이다. 질환표현형은 각각 repeat의 위치에서 명확히 map이 가능하기 때문이다. 만약 repeat 이외의 다른(변이)유전자가 관여 한다면, 어떤 환자는 가끔 양자가 공존해서 불안정하게 되어도, 다음 세대에 양쪽 유전자가 전달되는 확률은 절대 100%가 아니므로 불안정성의 요인은 신장한 repeat나 repeat에 매우 근접한 염기서열에 있다고 생각하는 것이 타당하다.

Repeat 주변의 DNA 다형을 조사하고, 신장한 repeat 주변의 haploidytype을 해석하여, 진화단계에서 repeat가 어떻게 변화되었는지를 알 수 있다. DRPLA의 경우에 대해 살펴보자⁴⁰⁾. Repeat에 근접해, 각각 2대립 유전자에서 형성되는 2종류의 다형을 발견하고, 다형 A와 다형 B라고 명명하였다. A2-B2에는 10회 정도의 비교적 짧은 repeat가 있으며 이 haploidytype은 아프리카인에게서 많이 관찰할 수 있다. A1-B2에는 15회 정도의 repeat가 있으며 이 haploidytype은 구미인에게 많이 발견된다. A1-

B1에는 17회 정도의 비교적 긴 repeat가 수반되고, 이 haploidytype은 아시아인에게서 많이 발견된다. 한편 일본인은 환자가 신장한 repeat 및 중간체 repeat는 모든 A2-B2 haploidytype을 갖고 있고, 또 소수로 존재하는 구미인 환자인 경우 A2-B2 haploidytype을 수반하고 있다. 원숭이나 쥐의 계놈은, A2-B2에 해당한다. 이는 DRPLA repeat가 그림 4에서 보는 바와 같이 지속적으로 신장하며, 또한 일본인이나 구미인에 상관없이 repeat 신장의 기원은 공통(창시자 효과)임을 보여준다. 이러한 창시자 효과는 DRPLA는 DM에서 확실히 알 수 있으며^{10, 41, 42)} 또 HD와 FRAXA에서도 복수기원이면서 창시자 염색체의 존재를 알 수 있다^{43, 44)}. Haploidytype 해석은 repeat 신장과 정 해석에 유효하지만, 하나의 요인에서 발생하는 경우는, repeat의 불안정성이 신장한 repeat 자신의 성질인지, 근

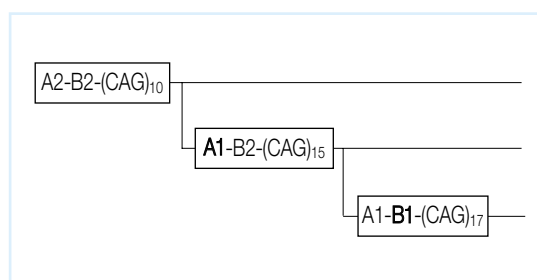


그림 4 진화과정에 의한 DRPLA repeat 신장과정

접영역에 불안정성에 유래한 것인지 구별하기 어렵다.

7. 모델동물

신장 repeat의 불안정성과 발증 기구를 해명하기 위하여, 다양한 transgenic mouse가 제작되어 있지만, 반드시 예상된 결과가 나오는 것은 아니다. CAG repeat 신장병은 우성이므로, 신장한 repeat를 가진 유전자를 부가적으로 도입한 쥐를 제작하였다. SBMA나 HD는 많은 연구실에서 제작되었지만 모든 쥐가 전혀 병 상태를 나타내지 않고, 도입된 신장 repeat는 안정적으로 자손에 전달되었다. 후자의 경우, 도입된 신장 repeat 주변 염색체 구조가 내재성 유전자와 다르거나, 쥐와 사람이 repeat 안정성이 다르기 때문이다. HD의 knock out mouse는 호모 치사성을 나타내지만, HD의 정상기능 해명에 이용할 수 있다⁴⁶⁻⁴⁸⁾. SCA1의 신장 repeat를 넣은 mouse는, 신장 repeat가 안정적으로 자손에게 전달되어 질병 상태를 나타낸다는 보고가 있지만, 질병상태가 실제로 신장 repeat에 기인하는가 하는 의문이 있다. FRAXA의 knock out mouse는 지능저

하 등 인간의 병증과 같은 표현형을 보이고 있다고 한다⁴⁹⁾. 그러나, 신장한 repeat를 도입한 FRAX의 표현형을 나타낸 쥐는 아직 제작되지 않았다.

▶맺음말

질환유전자에서 발견된 triplet repeat 신장은 새로운 분야를 개척하는 중요한 것이다. 향후, 어떤 분자기전에서 신장한 repeat가 불안정하게 될 것 인가하는 점과, 어떤 분자기전에서 발증이 될까라는 점이 해석의 중심이 될 것이다. 질환원인유전자를 확실히 규명한다 하더라도, 그 지식에 근거한 환자의 치료법이 개량되거나, 신치료법이 개발될 때까지는 상당한 차이가 있다. 질환원인유전자의 연구 성과가 빨리 환자에게 환원되어야 할 것이다.



참고문헌

- 1) McKusick, V. A. : *J. Am. Med. Assoc.*, **19**, 2351-2356(1993)
- 2) The Huntington's disease collaborative research group : *Cell*, **72**, 971-983(1993)
- 3) Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., Baker, E., Holman, K., Mulley, J.C., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., Richards, R. I. : *Science*, **252**, 1097-1102(1991)
- 4) Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M. F., Mandel, J. L. : *Science*, **252**, 1097-1102(1991)
- 5) Verkerk, A. J. M., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Eussen, B. E., van Ommen, G. - J. B., Blonden, L. A. J., Riggins, G. J., Chastain J. L., Kunst, C. B., Galjaard, H., Caskey, C. T., Nelson, D. L., Oostra, B. A., Warren, S. : *Cell*, **65**, 905-914(1991)
- 6) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bundo, M., Tkeda, T., Tadokoro, K., Kondo, I., Murayama, N., Tanaka, Y., Kikushima, H., Umino, K., Kurosawa, H., Fuukawa, T., Nihei, K., Inoue, T., Sano, A., Komure, O., Takahashi, M., Yoshizawa, T., Kanazawa, I., Yamada, M. : *Nature Genet.*, **6**, 14-18(1994)
- 7) Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., Hayashi, T., Saito, M., Tomoda, A., Miike, T., Naito, H., Ikuta, F., Tsuji, S. : *Nature Genet.*, **6**, 9-13(1994)
- 8) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Ohsaki, E., Shirayama, T., Tadokoro, K., Inoue, T., Yamada, M. : *Nature Genet.*, **6**, 14- 18(1994)
- 9) Yazawa, I., Nukina, N., Hashida, H., Goto, J., Yamada, M., Kanazawa, I. : *Nature Genet.*, **10**, 99-103(1995)
- 10) Yanagisawa, H., Fujii, K., Nagafuchi, S., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Akane, A., Nakamura, M., Sano, A., Komure, O., Kondo, I., Jin, D. K., Srensen, S. A., Potter, N. T., Young, S. R., Nakamura, K., Nukina, N., Nagao, Y., Tadokoro, K., Okuyama, T., Miyashita, T., Inoue, T., Kanazawa, I., Yamada, M. : *Hum. Mol. Genet.*, in press
- 11) Imamura, A., Ito, R., Tanaka, S., Fukutomi, O., Shimozaawa, N., Nishimura, M., Suzuki, Y., Kondo, N., Yamada, M., Orii, T. : *Neuropediatrics*, **25**, 234-237(1994)
- 12) Komure, O., Sanao, A., Nishino, N., Yamauchi, N., Ueno, S., Kondoh, K., Sano, N., Takahashi, M., Murayama, N., Kondo, I., Nagafuchi, S., Yamada, M., Kanazawa, I. : *Neurology*, **45**, 143-149(1995)
- 13) Parrish, J. E., Oostra, B. A., Verkerk, A. J. M. H., Richards, C. S., Reynolds, J., Spikes, A. S., Shaffer, L. G., Nelson, D. L. : *Nature Genet.*, **8**, 229-235(1994)
- 14) Nancarrow, J. K., Kremer, E., Holman, K., Eyre, H., Doggett, N. A., Le Paslier, D., Callen, D. F., Sutherland, G. R., Richards, R. I. : *Science*, **264**, 1938-1941(1994)

- 15) Jones, C., Penny, L., Mattina, T., Yu, S., Baker, E., Voullaire, L., Langdon, W. Y., Sutherland, G. R., Richards, R. I., Tunnacliffe, A. : *Nature*, **376**, 145-149(1995)
- 16) Jones, C., Slijepcevic, P., Marsh, S., Baker, E., Langdon, W. Y., Richards, R. I., Tunnacliffe, A. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 2123-2130(1994)
- 17) La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E., Fischbeck, K. H. : *Nature*, **352**, 77-79(1991)
- 18) Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M., Nakagome, Y. : *Nucl. Acids Res.*, **14**, 7569-7580(1986)
- 19) Smith, J. K., Gonda, V. E., Malamud, N. : *Neurology*, **8**, 205-209(1958)
- 20) Naito, H., Oyanagi, S. : *Neurology*, **32**, 798-807(1982)
- 21) Takahashi, H., Ohama, E., Naito, H., Takeda, S., Nakashima, S., Makifuchi, T., Ikuta, F. : *Neurology*, **38**, 1065-1070(1988)
- 22) Sano, A., Yamauchi, N., Kakimoto, Y., Komure, O., Kawai, J., Hazama, F., Kuzume, K., Sano, N., Kondo, I. : *Hum. Genet.*, **93**, 699-702(1994)
- 23) Orr, H. T., Chung, M., Banfi, S., Kwiatkowski Jr., T. J., Servadio, A., Beaudet, A. L., McCall, A. E., Duvick, L. A., Ranum, L. P. W., Zoghbi, H. Y. : *Nature Genet.*, **4**, 221-226(1993)
- 24) Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S., Kakizuka, A. : *Nature Genet.*, **8**, 221-228(1994)
- 25) MacDonald, M. E., Barnes, G., Srinidhi, J., Duyao, M. P., Ambrose, C. M., Myers, R. H., Gray, J., Conneally, P. M., Young, A., Penney, J., Shoulson, I., Hollingsworth, Z., Koroshetz, W., Bird, E., Vonsattel, J. P., Bonilla, E., Moscovitz, C., Penchaszadeh, G., Brzustowicz, L., Alvir, J., Bickham-Conde, J., Cha, J. H., Dure, L., Gomez, F., Ramos-Arroyo, M., Sanchez-Ramos, J., Snodgrass, S. R., de Young, M., Wexler, N. S., MacFarlane, J., Anderson, M. A., Jenkins, B., Gusella, J. F. : *J. Med. Genet.*, **30**, 982-986(1993)
- 26) Telenius, H., Kremer, B., Goldberg, Y. P., Theilmann, J., Andrew, S. E., Zeisler, J., Adam, S., Greenberg, C., Ives, E. J., Clarke, L. A., Hayden, M. R. : *Nature Genet.*, **6**, 409-414(1994)
- 27) Ueno, S., Kondoh, K., Kotani, Y., Komure, O., Kuno, S., Kawai, J., Hazama, F., Sano, A. : *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 663-666(1995)
- 28) Chong, S. S., McCall, A. E., Cota, J., Subramoney, S. H., Orr, H. T., Hughes, M. R., Zoghbi, H. Y. : *Nature Genet.*, **10**, 344-350(1995)
- 29) Servadio, A., Koshy, B., Armstrong, D., Antalffy, B., Orr, H. T., Zoghbi, H. Y. : *Nature Genet.*, **10**, 94-98(1995)
- 30) Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E. C., Mandel, J. L. : *Nature Genet.*, **10**, 104-110(1995)
- 31) Zahler, A. M., Lane, W. S., Stolk, J. A., Roth, M. B. : *Genes Dev.*, **6**, 837-847(1992)
- 32) Li, X. - J., Li, S. - H., Sharp, A. H., Nucifora Jr., F. C., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H., Ross, C. A. : *Nature*, **378**, 398-402(1995)
- 33) Knight, S. J., Flannery, A. V., Hirst, M. C., Campbell, L., Christodoulou, Z., Phelps, S. R., Pointon, J., Middleton-Price, H. R., Barncoat, A., Pembrey, M. E., Holland, J., Oostra, B. A., Bobrow, M., Davies, K. E. : *Cell*, **74**, 127-134(1993)
- 34) DeBouille, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., VanRoy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., Willems, P. J. : *Nature Genet.*, **3**, 31-35(1993)
- 35) Hagerman, R. J., Hull, C. E., Safanda, J. F.,

- Carpenter, I., Staley, L. W., O'Connor, R. A., Seydel, C., Mazzocco, M. M., Snow, K., Thibodeau, S. N. : *Am. J. Med. Genet.*, **51**, 298-308(1994)
- 36) Mahadevan, M., Tsilifidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., Leblond, S., Earle-MacDonald, J., De Jong, P. J., Wieringa, B., Korneluk, R. G. : *Science*, **255**, 1253-1255(1992)
- 37) Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick Jr., R. G., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., Wieringa, B., Korneluk, R., Perryman, M. B., Epstein, H. F., Caskey, C. T. : *Science*, **224**, 1256-1258(1992)
- 38) Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., Sohn, R., Zemelman, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S., Shaw, D. J., Housman, D. E. : *Cell*, **68**, 799-808(1992)
- 39) Dunne, P. W., Walch, E. T., Epstein, H. F. : *Biochemistry*, **33**, 10809-10814(1994)
- 40) Sabouri, L. A., Mahadevan, M. S., Narang, M., Lee, D. S., Surh, L. C., Korneluk, R. G. : *Nature Genet.*, **4**, 233-238(1993)
- 41) Imbert, G., Kretz, C., Johnson, K., Mandel, J. - L. : *Nature Genet.*, **4**, 72-76(1993)
- 42) Krahe, R., Eckhart, M., Ogunniyi, A. O., Osuntokun, B. O., Siciliano, M. J., Ashizawa, T. : *Am. J. Hum. Genet.*, **56**, 1067-1074(1995)
- 43) Squitieri, F., Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Spence, N., Zeisler, J., Nichol, K., Theinius, H., Lin, B., Napolitano, G., Morgan, K., Hayden, M. R. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 2103-2114(1994)
- 44) Hirst, M. C., Grewal, P. K., Davies, K. E. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1553-1560(1994)
- 45) Bingham, P. M., Garbern, J. Y., Merry, D. E., Fischbeck, K. H. : *Nature Genet.*, **9**, 191-196(1995)
- 46) Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marh, J. D., Phillips, A. G., Hayden, M. R. : *Cell*, **81**, 811-823(1995)
- 47) Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G. T., McNeil, S. M., Ge, P., Vonsattel, J. - p., Gusella, J. F., Joyner, A. L., MacDonald, M. E. : *Science*, **269**, 407-410(1995)
- 48) Zeitlin, S., Liu, J. - P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., Efstratiadis, A. : *Nature Genet.*, **11**, 155-163(1995)
- 49) The Dutch-Belgian Fragile X Consortium : *Cell*, **78**, 23-33(1994)
- 50) Sutherland, G. R., Richards, R. I. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3636-3641(1995)
- 51) Zoghbi, H. Y., Orr, H. T. : *Semin. Cell. Biol.*, **6**, 29-35(1995)
- 52) LaSpada, A. R., Paulson, H. L., Fischbeck, K. H. : *Ann. Neurol.*, **36**, 814-822(1994)
- 53) Yamada masaro : 日本臨床, **53**, 226-234(1995)
- 54) Yamada masaro : 生化学, **66**, 1320-1323(1994)